



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 195 25 784 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁸:
C 07 K 16/00
C 07 K 7/08
C 07 K 7/06
A 61 K 38/08
A 61 K 38/10

⑲ Aktenzeichen: 195 25 784.7
⑳ Anmeldetag: 14. 7. 95
㉔ Offenlegungstag: 16. 1. 97

DE 195 25 784 A 1

⑦1 Anmelder:
Boehringer Mannheim GmbH, 68305 Mannheim, DE

⑦4 Vertreter:
H. Weickmann und Kollegen, 81679 München

⑦2 Erfinder:
Endl, Josef, Dr., 82362 Weilheim, DE; Stahl, Peter,
Dr., 82347 Bernried, DE; Albert, Winfried, Dr., 82390
Eberfing, DE; Schendel, Dolores, Prof. Dr., 80469
München, DE; Boitard, Christian, Prof. Dr., Paris, FR;
Endert, Peter van, Dr., Paris, FR; Jung,
Günther-Gerhard, Prof. Dr., 72076 Tübingen, DE

⑤4 Autoreaktive Peptide aus der humanen Glutamin-Decarboxylase (GAD)

⑤7 Die Erfindung betrifft autoreaktive Peptide, Peptid-MHC-Komplexe, damit reagierende T-Zellsubpopulationen sowie diagnostische und therapeutische Anwendungen dieser Verbindungen.

DE 195 25 784 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Autoimmunreaktion hervorrufende Peptide, Komplexe dieser Peptide mit Molekülen des Major Histocompatibility Komplex (MHC) mit den Peptiden oder/und den Komplexen aus Peptiden und MHC-Molekülen reagierende T-Zellsubpopulationen sowie diagnostische und therapeutische Anwendungen dieser Verbindungen.

Die Aufklärung der molekularen Zusammenhänge bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen, wie etwa der rheumatoiden Arthritis und des juvenilen Diabetes (IDDM), ist innerhalb der letzten Jahre schnell fortgeschritten und läßt mittlerweile konkrete Anwendungen für die frühe Diagnose und eine kausale Therapie dieser Erkrankungen erkennen.

Heute gilt als gesichert, daß bei der Entstehung dieser Erkrankungen neben einer genetischen Disposition auch Umweltfaktoren eine Rolle spielen. Auf der Ebene der genetischen Risikofaktoren sind z. B. bei dem IDDM nur einige wenige Allele der MHC-Klasse II-Antigene eng mit dieser Erkrankung assoziiert. Somit besteht die Möglichkeit, über eine Analyse dieser Allele eine Risikogruppe für IDDM zu definieren (vgl. z. B. Thomson et al., Am. J. Hum. Genet. 43 (1988), 799—816 oder Todd et al., Nature 329 (1987), 599—604).

Bei den an der Entstehung von IDDM beteiligten Umweltfaktoren handelt es sich wahrscheinlich um exogene, als Immunogen wirksame Peptidsequenzen. In diesem Zusammenhang werden u. a. virale Antigene, die partielle Homologien zu körpereigenen Strukturen aufweisen, diskutiert. Unter besonderen Umständen, insbesondere in der postnatalen Phase, können durch die Nahrung aufgenommene Antigene, wie z. B. Rinder Serumalbumin, eine Immunantwort induzieren, welche aufgrund von Homologien zu körpereigenen Strukturen einen autoaggressiven Prozeß in Gang setzen können.

Typisch für den Krankheitsverlauf bei IDDM ist die progressive Zerstörung der Pankreas- β -Zellen durch cytotoxische Lymphozyten. Dieser Prozeß setzt schon lange vor einer erkennbaren Störung des Glucosestoffwechsels ein. Bei einer erkennbaren Manifestation des Diabetes sind bereits über 90% der β -Zellen zerstört. Es wäre deshalb außerordentlich wichtig, diese autoaggressiven T-Zellen frühzeitig bei Risikopersonen zu erfassen, um die betroffenen Individuen einer kausalen Therapie zuführen zu können.

Es gilt heute als gesichert, daß die Zerstörung von körpereigenem Gewebe bei Autoimmunerkrankungen anfänglich sehr langsam verläuft. Im Anfangsstadium dieses Prozesses erkennen die autoaggressiven T-Zellen wahrscheinlich nur ein oder wenige Autoantigene. Arbeiten von Kaufman et al. (Nature 368 (1993), 69—72) und Tisch et al. (Nature 368 (1993), 72—78) an einem Tiermodell (NOD-Maus) des Typ I-Diabetes haben ergeben, daß beim spontan auftretenden Diabetes dieses Mausstammes die Initiale, über T-Zellen vermittelte Auto-Immunreaktion gegen die Glutaminsäure-Decarboxylase gerichtet ist. Dabei werden in der NOD-Maus anfänglich nur 1 bis 2 Epitope am C-Terminus der Glutaminsäure-Decarboxylase (GAD) erkannt. Zu diesem Zeitpunkt lassen sich — wie oben ausgeführt — noch keine Veränderungen im Glucose-Metabolismus feststellen, während hingegen eine Perinsulitis bereits nachweisbar ist. Erst im weiteren Krankheitsverlauf weitet sich das Spektrum der von den autoaggressiven T-Zellen erkannten Peptide der GAD aus. Nach einer Manifestation des Diabetes sind auch präaktivierte T-Zellen gegen andere Inselzell-Antigene nachweisbar, z. B. Peripherin, Heat Shock Protein HSP 65 und Carboxypeptidase H.

Es gibt Hinweise, daß auch beim Menschen die Immunantwort gegen GAD ursächlich mit dem Entstehen des Typ I-Diabetes verknüpft ist. So lassen sich beispielsweise in über 80% der Prädiabetiker Autoantikörper gegen GAD nachweisen, wobei die ätiologische Rolle dieser Autoantikörper allerdings gering eingeschätzt wird. Man nimmt vielmehr an, daß beim Typ I-Diabetes eine progressive Zerstörung der Pankreas- β -Zellen durch T-Lymphozyten vorliegt. Diese gegen GAD gerichteten T-Lymphozyten konnten bereits von mehreren Forschergruppen nachgewiesen werden (Harrison et al., J. Clin. Invest. 89 (1992), 1161; Honeyman et al., J. Exp. Med. 177 (1993) 535). Die von diesen Gruppen gefundenen Autoantikörper reagierten mit einem aus den Aminosäuren 208 bis 404 bestehenden Peptidfragment des GAD 67 kd Moleküls.

In EP-A 0 519 469 werden autoimmun reagierende Polypeptide aus dem humanen GAD 65 kd Molekül offenbart. Diese Polypeptide haben die Aminosäuresequenz:

X-P-E-V-K-(T oder E)-K-Z,

wobei X eine fakultative, aus 1 bis 10 Aminosäuren ausgewählte Sequenz ist und Z eine fakultative, aus 1 bis 8 Aminosäuren ausgewählte Sequenz ist.

In der europäischen Patentanmeldung Nr. 95 100 764.0 werden autoreaktive Peptidsequenzen aus der humanen GAD 65 kd vorgeschlagen, umfassend:

(a) die Aminosäuresequenz

G-M-A-A-L-P-R-L-I-A-F-T-S-E-H-S-H-F-S-L-K-K-G-A-A,

(b) die Aminosäuresequenz

E-R-G-K-M-I-P-S-D-L-E-R-R-I-L-E-A-K-Q-K,

(c) eine der in Abb. 1 oder 2 dargestellten Aminosäuresequenzen,

(d) Teilbereiche der in (a), (b) oder/und (c) dargestellten Aminosäuresequenzen mit einer Länge von mindestens 6 Aminosäuren oder/und

(e) Aminosäuresequenzen, die eine im wesentlichen äquivalente Spezifität oder/und Affinität der Bindung

an MHC-Moleküle wie die in (a), (b), (c) oder/und (d) dargestellten Aminosäuresequenzen zeigen.

Eine der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe bestand darin, neue autoreaktive Peptide bereit zustellen, die mit T-Zellen aus Typ I-Diabetikern, insbesondere mit T-Zellen aus frisch entdeckten Typ I-Diabetikern reagieren und somit frühe Auto-Epitope definieren.

Diese Aufgabe wird gelöst durch Peptide, Peptid-Derivate oder analog bindende Moleküle, die zum Nachweis, zur Isolierung, zur Vermehrung, zur Anergisierung oder/und zur Elimination autoreaktiver T-Zellen geeignet sind. Ein Gegenstand der Erfindung ist somit ein Peptid oder Peptid-Derivat, umfassend:

(a) die Aminosäuresequenz (I)

D-V-N-Y-A-F-L-H-A-T-D-L-L-P-A-C-D-G-E-R,

(b) die Aminosäuresequenz (II)

S-N-M-Y-A-M-M-I-A-R-F-K-M-F-P-E-V-K-E-K,

(c) die Aminosäuresequenz (III)

N-W-E-L-A-D-Q-P-Q-N-L-E-E-I-L-M-H-C-Q-T,

(d) die Aminosäuresequenz (IV)

T-L-K-Y-A-I-K-T-G-H-P-R-Y-F-N-Q-L-S-T-G,

(e) die Aminosäuresequenz (V)

P-R-Y-F-N-Q-L-S-T-G-L-D-M-V-G-L-A-A-D-W,

(f) die Aminosäuresequenz (VI)

T-Y-E-I-A-P-V-F-V-L-L-E-Y-V-T-L-K-K-M-R,

(g) Teilbereiche der in (a), (b), (c), (d), (e) oder/und

(f) dargestellten Aminosäuresequenzen mit einer Länge von mindestens 6 Aminosäuren oder/und

(h) Aminosäuresequenzen, die eine im wesentlichen äquivalente Spezifität oder/und Affinität der Bindung an MHC-Moleküle wie die in (a), (b), (c), (d), (e), (f) oder/und (g) dargestellten Aminosäuresequenzen zeigen.

Die Aminosäuresequenzen (I) bis (VI) entsprechen den Aminosäureresten 86—105 (I), 246—265 (II), 146—165 (III), 166—185 (IV), 176—195 (V) und 206—225 (VI) der humanen GAD 65.

Überraschenderweise wurde festgestellt, daß Peptide, welche den Aminosäuresequenzen (I) bis (VI) der humanen GAD 65 entsprechen, eine spezifische Reaktion mit T-Zellsubpopulationen zeigten, die aus frisch entdeckten Typ I-Diabetikern isoliert wurden. Somit handelt es sich bei den erfindungsgemäßen Peptiden um frühe Autoepitope, mit deren Verwendung eine sehr frühe Diagnose des Typ I-Diabetes ermöglicht wird. Weiterhin können die erfindungsgemäßen Peptide auch therapeutisch angewendet werden, indem die mit den Peptiden reaktive T-Zellpopulation ausgeschaltet wird.

Bevorzugte Beispiele für T-Zellsubpopulationen, mit denen die erfindungsgemäßen Peptide der Aminosäuresequenzen (I) oder/und (II) reagieren, sind die T-Zelllinien R.B. und M.C. oder T-Zellen mit einer äquivalenten Bindungsspezifität.

Die Aminosäuresequenzen (I) bis (VI) sind Teilbereiche aus der 65 kD Isoform der humanen Glutaminsäure-Decarboxylase (GAD), deren vollständige Aminosäuresequenz von Bu et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), 2115 ff.) beschrieben wurde. Die Aminosäuresequenzen (I) bis (VI) wurden durch Anlegen von T-Zelllinien aus dem peripheren Blut von Typ I-Diabetikern und anschließende in vitro Stimulation mit rekombinanter humaner GAD und Testen dieser T-Zelllinien in einem Proliferationsassay mit synthetischen Peptidsequenzen gefunden, die aus der humanen GAD-Sequenz abgeleitet wurden.

Die erfindungsgemäßen Peptide können durch bekannte Syntheseverfahren mittels chemischer Methoden erzeugt werden oder durch Klonierung und Expression einer für diese Peptide codierenden DNA-Sequenz in einer geeigneten Wirtszelle, insbesondere E.coli, auf gentechnische Weise hergestellt werden.

Weiterhin umfaßt die vorliegende Erfindung auch Peptide mit Teilbereichen der spezifisch angegebenen Aminosäuresequenzen (I), (II), (III), (IV), (V) oder (VI), die eine Länge von mindestens 6 Aminosäuren, vorzugsweise von mindestens 8 Aminosäuren, besonders bevorzugt von mindestens 10 Aminosäuren und am meisten bevorzugt von mindestens 15 Aminosäuren aufweisen. Die minimale Länge eines erfindungsgemäßen Peptids wird durch seine Fähigkeit bestimmt, ein MHC-Molekül zu erkennen, mit ihm spezifisch zu binden und mit dem entsprechenden T-Zellrezeptor zu reagieren.

Die maximale Länge der aus der GAD stammenden und MHC-bindenden Abschnitte in einem erfindungsgemäßen Peptid beträgt vorzugsweise 100 Aminosäuren, besonders bevorzugt 50 Aminosäuren und am meisten bevorzugt 25 Aminosäuren.

Neben Peptiden mit den Aminosäuresequenzen (I) bis (VI) oder Teilbereichen davon betrifft die Erfindung

auch noch Peptide mit Aminosäuresequenzen, die im wesentlichen äquivalente Spezifität oder/und Affinität der Bindung an MHC-Moleküle wie die zuvor genannten Sequenzen zeigen und die vorzugsweise durch Substitution, Deletion oder Insertion einzelner Aminosäurereste oder kurzer Abschnitte von Aminosäureresten aus den Aminosäuresequenzen (I) bis (VI) abgeleitet sind oder analog bindende verfremdete Substanzen.

Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung auch Peptidvarianten, die in ihrer Sequenz mit den oben genannten Aminosäuresequenzen nicht völlig übereinstimmen, sondern nur gleiche oder nahe verwandte "Ankerpositionen" aufweisen. Die Bezeichnung "Ankerposition" bedeutet in diesem Zusammenhang einen für die Bindung an ein MHC-Molekül, insbesondere an ein MHC-Molekül der Klassen DR1, DR2, DR3, DR4 oder DQ, wesentlichen Aminosäurerest. Die Ankerposition für das DRB1 0401-Bindungsmotiv sind z. B. bei Hammer et al., Cell 74 (1993), 197—203, angegeben. Derartige Ankerpositionen sind in erfindungsgemäßen Peptiden konserviert oder gegebenenfalls durch Aminosäurereste mit chemisch sehr nahe verwandten Seitenketten ersetzt (z. B. Alanin durch Valin, Leucin durch Isoleucin und umgekehrt). Die Bestimmung der Ankerpositionen in den erfindungsgemäßen Peptiden kann auf einfache Weise durch Tests von Varianten der oben angegebenen spezifischen Peptide auf ihre Bindungsfähigkeit an MHC-Moleküle erfolgen. Erfindungsgemäße Peptide sind dadurch gekennzeichnet, daß sie eine im wesentlichen äquivalente Spezifität oder/und Affinität der Bindung an MHC-Moleküle wie die zuvor genannten Peptide zeigen. Vorzugsweise besitzen die aus Peptiden mit den Aminosäuresequenzen (I) bis (VI) abgeleiteten Peptide eine Sequenzhomologie von mindestens 30%, besonders bevorzugt von mindestens 50% und am meisten bevorzugt mindestens 60% mit den Ausgangspeptiden oder Teilsequenzen davon.

Beispiele für Varianten der spezifisch angegebenen Peptide sind die entsprechenden homologen Peptidabschnitte aus der humanen GAD 67, deren vollständige Aminosäuresequenz ebenfalls von Bu et al., supra, beschrieben wurde.

Der Begriff "im wesentlichen äquivalente Spezifität oder/und Affinität der Bindung an MHC-Moleküle" umfaßt auch eine gegenüber den Aminosäuresequenzen (I) bis (VI) verbesserte Bindungsspezifität oder/und -affinität, die insbesondere bei verkürzten Peptiden gefunden wird, die eine Länge von vorzugsweise 8 bis 15 Aminosäuren besitzen.

Weiterhin umfaßt die vorliegende Erfindung auch Peptid-Derivate. Dieser Begriff umfaßt Peptide, in denen eine oder mehrere Aminosäuren durch eine chemische Reaktion derivatisiert worden sind. Beispiele von erfindungsgemäßen Peptid-Derivaten sind insbesondere solche Moleküle, in denen das Backbone oder/und reaktive Aminosäureseitengruppen, z. B. freie Aminogruppen, freie Carboxylgruppen oder/und freie Hydroxylgruppen, derivatisiert worden sind. Spezifische Beispiele für Derivate von Aminogruppen sind Sulfonsäure- oder Carbon säureamide, Thiourethanderivate und Ammoniumsalze, z. B. Hydrochloride. Beispiele für Carboxylgruppenderivate sind Salze, Ester und Amide. Beispiele für Hydroxylgruppenderivate sind O-Acyl- oder O-Alkyllderivate. Weiterhin umfaßt der Begriff Peptid-Derivat gemäß vorliegender Erfindung auch solche Peptide, in denen eine oder mehrere Aminosäuren durch natürlich vorkommende oder nicht natürlich vorkommende Aminosäurehomologe der 20 "Standard"-Aminosäuren ersetzt werden. Beispiele für solche Homologe sind 4-Hydroxyprolin, 5-Hydroxylysin, 3-Methylhistidin, Homoserin, Ornithin, β -Alanin und 4-Aminobuttersäure.

Insbesondere sind solche Peptide bevorzugt, welche eine im wesentlichen äquivalente Spezifität oder/und Affinität der Bindung an MHC-Moleküle wie Peptide mit den Aminosäuresequenzen (I) bis (VI) aufweisen, die aber im Gegensatz zu diesen Peptiden keine Aktivierung von T-Zellen, sondern die Erzeugung eines anergen Zustands in T-Zellen hervorrufen.

Von der vorliegenden Erfindung werden auch Polypeptide erfaßt, in denen der MHC-bindende Peptidabschnitt Bestandteil einer größeren Polypeptideinheit ist, wobei die Verbindung von MHC-bindendem Peptid und dem Rest der Polypeptideinheit vorzugsweise eine Sollbruchstelle aufweist, z. B. eine Proteasespaltstelle.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Peptid oder Peptid-Derivat, das eine signalerzeugende Substanz bzw. eine Markierungsgruppe, z. B. eine Fluoreszenzmarkierungsgruppe (z. B. Rhodamin, Phycoerythrin), Digoxin, Biotin, eine radioaktive Gruppe oder eine Toxingruppe (z. B. Ricin, Cholera toxin etc.) trägt. Durch Kopplung des erfindungsgemäßen Peptids mit Markierungsgruppen kann das Peptid als diagnostisches Mittel für in vivo oder in vitro (z. B. Imaging) Anwendungen oder als therapeutisches Mittel eingesetzt werden. Weiterhin kann das erfindungsgemäße Peptid auch beispielsweise in cyclisierter Form oder in oligomerer Form vorliegen, wobei die für die Bindung an das MHC-Molekül wichtigen Sequenzen durch Spacerregionen voneinander getrennt sind.

Die Erfindung betrifft auch peptidmimetische Substanzen, die eine im wesentlichen äquivalente Spezifität oder/und Affinität der Bindung an MHC-Moleküle wie die zuvor genannten Peptide oder Peptid-Derivate zeigen. Peptidmimetische Substanzen oder Peptidmimetika sind Verbindungen, die Peptide in ihrer Wechselwirkung mit den MHC-Molekülen ersetzen können und gegenüber den nativen Peptiden eine erhöhte metabolische Stabilität, bessere Bioverfügbarkeit und größere Wirkungsdauer aufweisen können. Methoden zur Herstellung von Peptidmimetika sind beschrieben bei Giannis und Kolter, Angew. Chem. 105 (1993), 1303—1326, Lee et al., Bull. Chem. Soc. Jpn. 66 (1993), 2006—2010 und Dorsch et al., Kontakte (Darmstadt) (1993) (2), 48—56. Bezüglich der Herstellung erfindungsgemäßer peptidmimetischer Substanzen wird auf die Offenbarung dieser Literaturstellen verwiesen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Komplex, der mindestens ein erfindungsgemäßes Peptid, Peptid-Derivat oder Peptidmimetikum und mindestens ein MHC-Molekül oder ein peptidbindendes Derivat eines MHC-Moleküls umfaßt. In diesem Komplex ist ein Peptid, Peptid-Derivat oder Peptidmimetikum mit einer Bindungskonstante von vorzugsweise mindestens 10^{-7} l/mol, besonders bevorzugt im Bereich von 10^{-8} — 10^{-9} l/mol, an ein MHC-Molekül oder ein peptidbindendes Derivat eines MHC-Moleküls gebunden. Alternativ kann das Peptid, Peptid-Derivat oder Peptidmimetikum auch kovalent an das MHC-Molekül gekoppelt sein, z. B. über einen Photolinker oder als kovalente genetische Peptid-MHC-Fusion. Ein derartiges Peptid-

MHC-Fusionsprotein enthält vorzugsweise eine HLA-DR beta-Kette und ein damit genetisch fusioniertes autoreaktives Peptid. Besonders bevorzugt enthält der Komplex ein MHC-Klasse II-Molekül oder ein peptidbindendes Derivat davon.

Das MHC-Klasse II-Molekül ist vorzugsweise vom Typ DR, beispielsweise vom Typ DR1, DR2 oder DQ6. Besonders bevorzugt ist das MHC-Klasse II-Molekül vom Subtyp DR B1 0101, DR B1 1501, DR B1 1502 oder DQ B1 0602. Die T-Zelllinie R.B. proliferiert mit dem autoreaktiven Peptid der Aminosäuresequenz 86—105 von GAD 65 kd in Anwesenheit des DR B1-Allels 0101. Die T-Zelllinie M.C. proliferiert mit dem autoreaktiven Peptid der Aminosäuresequenz 246—265 von rGAD in Gegenwart des DR B1-Allels 1501 oder/und des DQ B1-Allels 0602.

Die Nukleotidsequenzen der für ein MHC-Klasse II-Molekül der obigen Subtypen kodierenden Gene sind veröffentlicht in Corell et al. (Mol. Immunol. 28 (1991), 533—543). Auf den Inhalt dieser Publikation wird hiermit Bezug genommen.

Der Begriff "peptidbindendes Derivat eines MHC-Moleküls" umfaßt Fragmente von MHC-Molekülen, die durch proteolytische Spaltung nativer MHC-Moleküle oder durch rekombinante DNA-Techniken hergestellt sind und ihre peptidbindenden Eigenschaften im wesentlichen beibehalten haben. Weiterhin sind unter diesem Begriff Fusionsproteine zu verstehen, die neben einem für die Peptidbindung verantwortlichen MHC-Anteil noch weitere Polypeptid-Komponenten enthalten.

Die erfindungsgemäßen Peptid-MHC-Komplexe werden vorzugsweise durch Assoziierung peptidfreier MHC-Moleküle oder MHC-Molekülderivate mit den erfindungsgemäßen Peptiden, Peptid-Derivaten oder Peptidmimetika hergestellt. Die Herstellung von peptidfreien MHC-Molekülen kann beispielsweise durch Entfaltung von nativen MHC-Molekülen, um gebundene Peptide zu dissoziieren, und Rückfaltung der leeren MHC-Moleküle erfolgen (siehe Dornmair und McConnell, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990), 4134—4138 und WO91/14701).

Andererseits können peptidfreie MHC-Moleküle auch durch rekombinante Herstellung von MHC-Molekülen oder Derivaten davon gewonnen werden. Beispiele hierfür sind die Expression von MHC-Klasse II-Molekülen in Fibroblasten (Germain und Malissen, Ann. Rev. Immunol. 4 (1990), 281—315) sowie die Expression von löslichen MHC-Klasse II-Molekülderivaten ohne Membrananker in CHO-Zellen (Wettstein et al., J. Exp. Med. 174 (1991), 219—228; Buelow et al., Eur. J. Immunol. 23 (1990), 69—76) und mittels des Baculovirus-Expressionssystems in Insektenzellen (Stern und Wiley, Cell 68 (1992), 465—477; Scheirle et al., J. Immunol. 149 (1992), 1994—1999). Auch MHC-Klasse I-Moleküle wurden in CHO-Zellen (Fahnestock et al., Science 258 (1992), 1658—1662) in Insektenzellen (Jackson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), 12117—12120; Matsamura et al., J. Biol. Chem. 267 (1992), 23589—23595) sowie in Fibroblasten (Mage et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), 10658—10661) exprimiert.

Weiterhin ist auch die Expression von peptidfreien MHC-Molekülen in Ecoli bekannt (Parker et al., Mol. Immunol. 29 (1992), 371—378; Zhang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), 8403—8407; Garboczi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), 3429—3433; Altman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993), 10330—10334). Auf die in diesen Veröffentlichungen beschriebenen Techniken zur rekombinanten Expression von MHC-Molekülen oder MHC-Molekülderivaten wird für die vorliegende Erfindung Bezug genommen.

Vorzugsweise ist der MHC-Bestandteil des erfindungsgemäßen Komplexes ein rekombinantes MHC-Molekül oder ein peptidbindendes Derivat davon und besonders bevorzugt ein lösliches MHC-Molekülderivat, bei dem der Membrananker teilweise oder vollständig deletiert ist.

Zur Identifizierung von MHC-Molekülen, welche das erfindungsgemäße autoreaktive Peptid präsentieren, werden die Antigen präsentierenden Zellen eines Spenders mit dem erfindungsgemäßen Peptid in markierter Form inkubiert, wobei vorzugsweise zuerst gebundene Peptide durch Denaturierung nativer MHC-Moleküle dissoziiert werden. Anschließend können die markierten MHC-Peptid-Komplexe mit Subtyp-spezifischen Antikörpern, die gegen Framework-spezifische Determinanten der MHC-Moleküle gerichtet sind, immunpräzipitiert und aufgrund des Vorhandenseins der markierten Peptide identifiziert werden.

Alternativ können als Antigen präsentierende Zellen auch EBV (Epstein-Barr-Virus) transformierte B-Zellen des Spenders verwendet werden.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Komplexe aus einem rekombinanten MHC-Molekülderivat kann beispielsweise so erfolgen, daß DNA-Fragmente für die löslichen Teile der α - und β -Ketten eines MHC-Moleküls, z. B. eines MHC-DR1-, DR2- oder DQ1-Moleküls durch PCR isoliert werden, wobei als Template cDNA aus einer EBV transformierten B-Zelllinie des Spenders benutzt wird, welche das entsprechende MHC-Molekül exprimiert. Bei diesem Schritt wird vorzugsweise am C-Terminus der α - und der β -Kette durch entsprechende Auswahl des PCR-Primers eine Reinigungshilfe, z. B. ein Oligohistidinsegment (z. B. ein Hexa-Histidin-Segment), eingeführt. Die PCR-Produkte können anschließend in Ecoli subkloniert und als Inclusion-Bodies exprimiert werden. Die Inclusion-Bodies können nach bekannten Verfahren (vgl. Literaturstellen zur Expression von MHC-Molekülen in Ecoli, supra) solubilisiert und die MHC-Proteine mittels Metall-Chelat-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Anschließend werden die α - und β -Untereinheiten in Anwesenheit des Peptids renaturiert.

Der erfindungsgemäße Peptid-MHC-Komplex kann auch eine wie oben beschriebene Markierungsgruppe tragen, wobei die Markierungsgruppe sowohl am Peptidbestandteil als auch am MHC-Bestandteil des Komplexes durch bekannte Methoden gebunden sein kann.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein oligomerisierter Peptid-MHC-Komplex, der mindestens 2 MHC-Moleküle oder MHC-Molekülderivate enthält, die über kovalente oder nichtkovalente Wechselwirkungen assoziiert sind. Ein derartiger oligomerisierter Peptid-MHC-Molekül-Komplex hat gegenüber bekannten (bezüglich des MHC-Moleküls) monomeren Komplexen den Vorteil einer höheren Affinität und somit einer verbesserten diagnostischen oder/und therapeutischen Wirksamkeit.

In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann ein derartiger oligomerisierter Komplex durch kovalente Quervernetzung von monomeren Peptid/MHC-Molekül-Komplexen über chemische Kopplungsreagenzien, z. B. N-Succinimidyl-3(2-pyridylthio)propionat, 3-Maleimidobenzoyl-N-hydroxy-succinimidester, Maleimidohexanoyl-N-hydroxy-succinimidester, Bis(maleimidomethyl)ether, Disuccinimidylsuberat, Glutardialdehyd etc. nach bekannten Verfahren hergestellt werden. Gegebenenfalls können auch einzelne Aminosäuren der Peptidkomponente oder der MHC-Komponente so verändert sein, daß spezielle Kopplungsreagenzien an dieser Stelle bevorzugt angreifen. So lassen sich durch Einführung von zusätzlichen Cystein- oder Lysin-Resten auf rekombinantem Wege bei der Proteinkomponente bzw. durch chemische Synthese bei der Peptidkomponente Kopplungen über SH-Linker bzw. über Aminogruppen erzielen.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann der oligomerisierte Peptid-MHC-Komplex so hergestellt werden, daß die an das MHC-Molekül bindende Peptidkomponente als Oligomer eingesetzt wird, d. h. als ein Peptidmolekül, das mindestens 2 MHC-bindende Bereiche enthält, wobei die für die Bindung an das MHC-Molekül wichtigen Sequenzen durch Spacerregionen voneinander getrennt sind. Diese Spacerregionen bestehen üblicherweise aus 10–15 Aminosäuren. Man verwendet kleine, hydrophile Aminosäuren, z. B. Glycin, Alanin, Serin, Prolin bzw. Kombinationen davon. Bei einer Renaturierung von peptidfreien MHC-Molekülen in Anwesenheit dieser Peptidoligomere entsteht der erfindungsgemäße oligomerisierte Komplex, der durch die oligomerisierte Peptidkomponente über nicht-kovalente Wechselwirkungen vernetzte MHC-Moleküle enthält.

Weiterhin können oligomerisierte Peptid-MHC-Komplexe durch Modifikation rekombinant hergestellter MHC-Moleküle erzeugt werden. So kann bei Herstellung der Vektoren für die Expression rekombinanter α - bzw. β -Ketten von MHC-Klasse II-Molekülen ein Gensegment, vorzugsweise jeweils am C-Terminus, einkloniert werden, das für ein Epitop codiert, das von einem Antikörper erkannt wird. Dieser Antikörper kann vom IgG-Typ, vorzugsweise aber vom IgM-Typ sein. Die renaturierten monomeren Peptid/MHC-Komplexe werden dann mit einem, das eingeführte Epitop erkennenden Antikörper inkubiert, so daß nicht-kovalent vernetzte Immunkomplexe, bestehend aus mehreren Antikörpern und mehreren Peptid-MHC-Komplexen, erzeugt werden. Die Einführung von DNA-Segmenten, die für ein Epitop codieren, in die für die α - bzw. β -Kette des MHC-Moleküls codierenden DNA-Fragmente kann mittels bekannter molekularbiologischer Techniken erfolgen, z. B. durch Insertion in Restriktionsstellen oder durch zielgerichtete Mutagenese.

Der erfindungsgemäße oligomerisierte Peptid-MHC-Komplex enthält ein Peptid, das die Aminosäuresequenzen (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), Teilbereiche davon oder/und davon abgeleitete Aminosäuresequenzen umfaßt, oder ein Peptid-Derivat oder Peptidmimetikum davon. Der oligomerisierte Komplex kann vorzugsweise als diagnostisches oder therapeutisches Reagenz bei Typ I-Diabetes eingesetzt werden.

Die Erfindung betrifft somit auch eine pharmazeutische Zusammensetzung, die ein Peptid, Peptid-Derivat, Peptidmimetikum oder/und einen Peptid-MHC-Komplex als aktive Komponente gegebenenfalls in Kombination mit pharmazeutisch üblichen Zusatzstoffen enthält. Die Zusammensetzung kann weiterhin eine akzessorische stimulierende Komponente enthalten, z. B. Cytokine wie IL-2 und IL-4 oder/und das Oberflächenantigen B7 (Wyss-Coray et al., Eur. J. Immunol. 23 (1993), 2175–2180; Freeman et al., Science 262 (1993), 909–911), das mit dem Oberflächenmolekül CD-28 auf einer T-Zelle binden kann. Die Anwesenheit der akzessorischen stimulierenden Komponente kann die therapeutische Wirkung der Zusammensetzung verbessern oder/und modifizieren.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner die Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die ein Peptid, Peptid-Derivat, Peptidmimetikum oder/und einen Peptid-MHC-Komplex enthält zur Herstellung eines Mittels für die Diagnose von Erkrankungen oder einer Prädisposition für Erkrankungen, die das Immunsystem beeinflussen, oder für die Diagnose von Tumorerkrankungen oder einer Prädisposition für Tumorerkrankungen, insbesondere für die Diagnose von Autoimmunerkrankungen oder einer Prädisposition für Autoimmunerkrankungen, z. B. Diabetes Typ I oder Typ II, vorzugsweise Diabetes Typ I.

Analoge diagnostische Anwendungen sind jedoch auch bei anderen Autoimmunerkrankungen möglich. Beispiele derartiger Autoimmunerkrankungen sind Multiple Sklerose, wo reaktive T-Zellen gegen das Myelin Basic Protein oder das Proteolipid-Protein bestimmt werden können, rheumatoide Arthritis, wo reaktive T-Zellen gegen Kollagen Typ II, Cytokeratine und Hsp 65 bestimmt werden können, Basedow-Krankheit, wo reaktive T-Zellen gegen Thyroidperoxidase bestimmt werden können.

Allgemein ist die diagnostische Anwendung bei allen Erkrankungen möglich, die das Immunsystem beeinflussen, wie z. B. auch bei der Arteriosklerose. Hier wurde eine Assoziation der Krankheit mit einer Immunantwort gegen das Heat Shock Protein Hsp 65 nachgewiesen (Xu et al., Lancet 341, 8840 (1993), 255–259).

Noch eine weitere Anwendung ist der diagnostische Nachweis von T-Zellen, die gegen Tumorantigene reagieren. Beispiele hierfür sind T-Zellen gegen ein Melanom-assoziiertes Antigen MAGE 1, die aus Melanompatienten isoliert wurden (van der Bruggen et al., Science 254 (1991), 1643–1647). Der Nachweis dieser T-Zellen kann mit erfindungsgemäßen oligomerisierten Komplexen schon in einem Stadium erfolgen, in dem der Tumor aufgrund einer noch zu geringen Zellmasse mit herkömmlichen Methoden noch nicht nachweisbar ist. Ferner könnte der Nachweis von spezifisch reagierenden T-Zellen auch zur Verlaufskontrolle bei einer Anti-Tumorkinierung eingesetzt werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Verfahren zur Bestimmung einer spezifischen T-Zell-Subpopulation, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man eine T-Zellen enthaltende Probe, die vorzugsweise aus einer Körperflüssigkeit, z. B. Vollblut, stammt, mit einem erfindungsgemäßen Peptid, Peptid-Derivat, Peptidmimetikum oder/und einem erfindungsgemäßen Komplex in Kontakt bringt und die Reaktion von T-Zellen mit dem Peptid oder Komplex bestimmt. Eine spezifische Reaktion von T-Zellen mit dem Komplex oder dem Peptid kann z. B. durch eine erhöhte T-Zellenproliferation nachgewiesen werden, die sich durch den Einbau von Radioaktivität messen läßt. Andererseits kann die Reaktion von T-Zellen auch direkt durch Verwen-

dung eines markierten Peptids oder Komplexes bestimmt werden. Bei dieser Ausführungsform werden das Peptid oder der Komplex vorzugsweise mit einer daran gekoppelten Fluoreszenzmarkierungsgruppe verwendet. Die Auswertung kann beispielsweise durch FACS-Analyse erfolgen, wobei die T-Zellen mit einem ersten Fluoreszenzmarker, der an einen T-Zell-spezifischen Antikörper gekoppelt ist, und dann mit dem Peptid-MHC-Komplex, der mit einem zweiten Fluoreszenzmarker gekoppelt ist, in Kontakt gebracht werden und das Vorhandensein von doppelmarkierten Zellen durch fluorographische Analyse bestimmt wird. Auf diese Weise wird eine T-Zell-Subpopulation bestimmt, die durch ihre Reaktivität mit einem erfindungsgemäßen Peptid oder Peptid-Derivat oder/und mit einem erfindungsgemäßen Peptid-MHC-Komplex charakterisiert ist. Aufgrund der geringen Konzentration der spezifischen T-Zell-Population im Blut erfolgt als erster Schritt des Verfahrens vorzugsweise eine Selektion auf präaktivierte T-Zellen, z. B. eine selektive Anreicherung von IL-2-Rezeptor-positiven T-Zellen durch Inkubation mit IL-2 oder/und durch Inkubation mit IL-2-Rezeptor-Antikörper und anschließende Separation der Antikörper-bindenden Zellen beispielsweise mit immunmagnetischen Methoden. Andererseits kann die Selektion auf präaktivierte Zellen erst nach dem Kontakt der T-Zellen mit dem Peptid oder dem Komplex erfolgen.

In einer Abwandlung dieses Verfahrens kann auch das Verhältnis von präaktivierten autoreaktiven T-Zellen, d. h. T-Zellen mit dem IL-2-Rezeptor als Oberflächenmarker, zu nicht-aktivierten autoreaktiven T-Zellen, d. h. T-Zellen ohne den IL-2-Rezeptor, bestimmt werden.

Dieses Verfahren kann insbesondere zur Diagnose von Typ I-Diabetes, aber auch bei anderen das Immunsystem beeinflussenden Erkrankungen bzw. zur Diagnose einer Prädisposition für derartige Erkrankungen angewendet werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die ein Peptid, Peptid-Derivat, Peptidmimetikum oder/und einen Peptid-MHC-Komplex enthält, zur Herstellung eines Mittels für die Therapie oder Prävention von Erkrankungen, die das Immunsystem beeinflussen. Zur therapeutischen Anwendung der erfindungsgemäßen Peptide und der erfindungsgemäßen Peptid-MHC-Komplexe können beispielsweise mit Toxinen gekoppelte Peptide oder Peptid-MHC-Komplexe verwendet werden, andererseits können aber auch Peptide alleine oder als Bestandteile des Komplexes eingesetzt werden, die zwar eine Bindung an den T-Zellrezeptor ermöglichen, aber keine Aktivierung der T-Zelle hervorrufen, d. h. die also anergisierend wirken.

Die therapeutische Wirkung derartiger anergisierender Peptidanaloga beruht darauf, daß der T-Zellrezeptor (TCR) zur Aktivierung der T-Zelle mit einem Peptid wechselwirken muß, das von einem MHC-Antigen der Klasse I oder Klasse II präsentiert wird. Dabei sind insbesondere Aminosäuren in Ankerpositionen des Peptids für die Bindung an das MHC-Molekül verantwortlich, während andere Aminosäuren im Peptid zur Wechselwirkung mit dem TCR beitragen und somit eine T-Zellstimulation hervorrufen. Durch Aminosäuresubstitutionen in den Peptiden können nun Peptidanaloga hergestellt werden, die aufgrund des Vorhandenseins der Ankerpositionen noch an das MHC-Molekül binden, andererseits aber nur eine partielle oder keine T-Zellaktivierung hervorrufen (vgl. z. B. Sloan-Lancaster et al, Nature 363 (1993), 156—159). Z.B. können solche Peptidanaloga bewirken, daß die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle hochreguliert wird (z. B. IL2-Rezeptor, LFA-1), daß jedoch keine Proliferation oder Cytokin-Expression erfolgt. T-Zellen, die mit einem solchen Peptidanalogen in Wechselwirkung treten, gehen in einen sogenannten anergen Zustand über, d. h. sie können auch durch eine nachfolgende reguläre Stimulation mit einem immunogenen Peptid nicht mehr proliferieren. Dieser anerge Zustand hält mindestens 7 Tage an und läßt sich deshalb therapeutisch bei der Behandlung einer Autoimmunerkrankung nutzen.

Ein weiterer therapeutischer Aspekt der vorliegenden Erfindung besteht darin, daß das Peptid bzw. der Komplex aus Peptid und MHC-Molekül als Antigen verwendet werden kann. Ein derartiges Antigen kann dabei als Immunogen, d. h. als ein die Immunantwort stimulierendes Mittel oder als Tolerogen wirken, d. h. als ein Mittel, das eine Immuntoleranz hervorruft. Die Verwendung als Immunogen kann z. B. bei der Vakzinierung gegen Tumorantigene Verwendung finden. Statt den bisher zu diesem Zweck verwendeten ganzen Tumorzellen ist es möglich, daß von den T-Zellen erkannte tumorspezifische Peptide im Komplex mit dem entsprechenden MHC-Molekül, insbesondere in Form eines oligomerisierten Komplexes, zu injizieren, um eine T-Zellantwort gegen den Tumor zu erzeugen. Zur Erhöhung der Immunstimulation kann dieser Komplex auch in Kombination mit zusätzlichen stimulierenden Substanzen verabreicht werden. Zu diesem Zweck sind beispielsweise Cytokine, wie etwa IL2 oder IL4 geeignet, die gegebenenfalls und vorzugsweise kovalent mit dem erfindungsgemäßen Peptid-MHC-Komplex verknüpft sind. Eine weitere Möglichkeit ist die Assoziation des Komplexes mit akzessorischen Komponenten für die T-Zellaktivierung, insbesondere mit für Antigen präsentierenden Zellen essenziellen Oberflächenmolekülen, z. B. dem Oberflächenmolekül B7.

Eine bevorzugte therapeutische Formulierung ist der Einbau von mit Peptid beladenen MHC-Molekülen in künstliche Vesikel, z. B. Lipidvesikel, die gegebenenfalls noch weitere membrangebundene Moleküle tragen können, wie z. B. B7 oder/und immobilisierte Cytokine.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Isolierung von T-Zellsubpopulationen, die mit einem erfindungsgemäßen Peptid oder Peptid-MHC-Komplex reagieren. Bei einem solchen Verfahren bringt man eine T-Zellen enthaltende Probe, die z. B. aus einer Körperflüssigkeit stammt, die einem Patienten vorher entnommen wurde, mit einem erfindungsgemäßen Peptid oder einem erfindungsgemäßen Peptid-MHC-Komplex in Kontakt, identifiziert die mit dem Peptid oder Komplex reagierenden T-Zellen und trennt sie gegebenenfalls von anderen T-Zellen ab. Auch hier kann vor oder/und nach dem Kontakt der T-Zellen mit dem Peptid oder dem Komplex vorzugsweise eine Selektion auf präaktivierte T-Zellen, d. h. T-Zellen mit dem IL-2-Rezeptor, erfolgen.

Bei einem solchen Verfahren kann man das Peptid oder den Peptid-MHC-Komplex in immobilisierter Form auf einem Träger verwenden, wodurch die Abtrennung der positiv reagierenden T-Zell-Population von anderen

T-Zellen vereinfacht wird. Aus den auf diese Weise isolierten T-Zell-Subpopulationen können durch Restimulation T-Zelllinien angelegt werden. Diese autoreaktive T-Zelllinien können dann zur Immunisierung von Patienten verwendet werden.

Eine spezifische Immuntherapie des Typ I-Diabetes umfaßt zunächst die Isolierung von spezifischen T-Zelllinien gegen ein Autoantigen, z. B. GAD 65 aus IDDM-Patienten. Dann erfolgt eine Bestimmung der Feinspezifität der T-Zelllinien, d. h. die Identifizierung der autoreaktiven Peptide. Für die spätere Inokulation der Patienten werden solche T-Zelllinien ausgewählt, die ein prädominantes Peptid erkennen, d. h. ein Peptid, gegen das mehrere der isolierten T-Zelllinien reagieren. Insbesondere handelt es sich dabei um T-Zelllinien, welche ein Peptid mit den Aminosäuresequenzen (I), (II), (III), (IV), (V) oder (VI) erkennen.

Falls sich bei einem Patienten kein eindeutig prädominantes Peptid findet, müssen für die spätere Inokulation mehrere T-Zelllinien gemischt werden. Die ausgewählten T-Zellklone werden vor der Inokulation nochmals mit Antigen-präsentierenden Zellen und den entsprechenden Peptiden stimuliert, um eine gute Expression von Aktivierungsmolekülen und insbesondere der T-Zellrezeptoren zu gewährleisten. Dann werden die T-Zelllinien inaktiviert, z. B. durch Hitzebehandlung oder/und radioaktive Bestrahlung, vorzugsweise mit einer Dosis im Bereich von 4000—10000 rad, besonders bevorzugt ca. 8000 rad, und subkutan in einer Zellenzahl von vorzugsweise 10^7 bis 5×10^7 in den Patienten, aus dem sie gewonnen wurden, injiziert. Üblicherweise werden mindestens drei Injektionen über einen Zeitraum von 6 bis 12 Monaten verteilt.

Anschließend kann man die T-Zellantwort des Patienten auf das Inokulat testen. Hierzu isoliert man die peripheren Blutlymphozyten (PBLs) des Patienten, z. B. über Ficoll-Dichte-Gradientenzentrifugation, und testet die Proliferation gegen das Inokulat in einem Standard-Proliferationstest. Nach erfolgreich verlaufender Immunisierung sollte eine deutliche Proliferation der Patienten-PBLs gegen das Inokulat nachweisbar sein. Eine weitere Kontrolle des Immunisierungserfolgs kann durch Bestimmung der Frequenzen der GAD-reaktiven T-Zellen des Patienten im Verlauf der Immunisierung erfolgen. Dies kann z. B. nach dem Standardverfahren der Limiting Dilution mit autologen Stimulatorzellen erfolgen, die nach Inkubation mit GAD mit z. B. 4000 rad bestrahlt worden sein. Bei erfolgreich verlaufender Immunisierung nimmt die Frequenz der autoreaktiven T-Zellen deutlich ab.

Nach weiterer Eingrenzung der von den regulatorischen T-Zellen erkannten Oberflächenstrukturen auf den T-Zellen des Inokulates kann auch mit Teilstrukturen der regulatorischen T-Zellen immunisiert werden, z. B. mit Segmenten des T-Zellrezeptors.

Andererseits können bei einer Antitumorkur auch teilungsfähige T-Zellen reinjiziert werden, die zu einer aktiven Immunisierung des Patienten gegen Tumorzellen führen können.

Bei den diagnostischen und therapeutischen Verfahren zur Identifizierung bzw. Aktivierung/Inhibierung von spezifischen T-Zellsubpopulationen kann anstelle der erfindungsgemäßen Peptide oder Peptid-MHC-Moleküle auch ein anti-idiotypischer Antikörper verwendet werden, der die Wirkung des MHC-Peptid-Komplexes nachahmt. Derartige Antikörper können ohne weiteres erhalten werden, indem eine gegen ein bestimmtes Peptid spezifische T-Zellsubpopulation als Immunogen zur Erzeugung eines Antikörpers (z. B. in einer Maus) verwendet wird oder indem zuerst ein erster Antikörper gegen den MHC-Peptid-Komplex und dann ein antiidiotypischer Antikörper gegen den ersten Antikörper erzeugt wird.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit auch ein Antikörper (erster Antikörper) gegen ein erfindungsgemäßes Peptid oder Peptid-Derivat oder einen erfindungsgemäßen Komplex, erhältlich durch Immunisierung, mit dem Peptid, Peptid-Derivat oder Komplex und Gewinnung eines durch Immunisierung erzeugten Antikörpers, vorzugsweise eines durch das Verfahren von Köhler und Milstein oder Weiterentwicklungen davon hergestellten monoklonalen Antikörpers.

Schließlich betrifft die Erfindung auch einen anti-idiotypischen Antikörper gegen den ersten Antikörper, erhältlich durch Immunisierung mit dem ersten Antikörper, der gegen das Peptid oder Peptid-Derivat oder den Komplex gerichtet ist, und Gewinnung eines durch die Immunisierung erzeugten anti-idiotypischen Antikörpers.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine T-Zelle, die mit einem erfindungsgemäßen autoreaktiven Peptid, Peptid-Derivat oder Peptidmimetikum oder einem Komplex aus Peptid und MHC-Molekül reagiert. Bevorzugte Beispiele sind T-Zellen, die von den T-Zelllinien R.B. oder M.C. stammen oder eine äquivalente T-Zellrezeptor-Bindungsspezifität aufweisen, d. h. ein von einem MHC-Molekül präsentiertes Peptid oder Peptid-Derivat der Aminosäuresequenzen (I), (II), (III), (IV), (V) oder/und (VI) oder/und Teilbereichen dieser Aminosäuresequenzen erkennen.

Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung auch die Verwendung von Peptiden aus GAD, insbesondere humaner GAD 65, davon abgeleiteten Peptid-Derivaten oder Peptidmimetika zur Herstellung eines Arzneimittels, das bei Verabreichung an Diabetes-Patienten zur Ausbildung einer Immuntoleranz führt. Vorzugsweise werden hierfür Peptide der Aminosäuresequenzen (I), (II), (III), (IV), (V), (VI) bzw. mit den in EP 95 100 764.0 vorgeschlagenen Aminosäuresequenzen, Teilbereiche dieser Peptide mit einer Länge von mindestens 6 Aminosäuren oder/und Aminosäuren mit einer im wesentlichen äquivalenten Spezifität oder/und Affinität der Bindung an MHC-Moleküle wie die obengenannten Peptidsequenzen verwendet. Vorzugsweise haben die Peptide eine Länge von mindestens 8 Aminosäuren, besonders bevorzugt eine Länge von 10 bis 25 Aminosäuren.

Grundlage dieser Erfindung sind Beobachtungen, die bei einer in vitro-Verwendung von Peptiden zur T-Zellstimulation gemacht wurden. Wenn man nämlich bereits etablierte T-Zelllinien mit einem als reaktiv identifizierten Peptid, z. B. einem Peptid mit einer Länge von 20 Aminosäuren, stimuliert, dann erfolgt eine Proliferation, die annähernd so hoch ist wie bei Verwendung des nativen Antigens, z. B. rekombinante humane GAD 65 kd. Wenn man die solchermaßen expandierten T-Zellen in einer zweiten Runde nach ca. 10 Tagen nochmals restimuliert, erhält man eine viel schwächere proliferative Antwort als wenn in der ersten Runde das native Antigen verwendet wurde. Dieser Befund ist unabhängig davon, ob man bei der zweiten Runde wieder das Peptid oder das native Antigen verwendet. Eine dritte Restimulation endet meistens in einem vollständigen Absterben der

T-Zellen, auch wenn als Antigen native GAD 65 kd verwendet wird.

Für diese Anwendungsform werden die Peptide in relativ hohen Dosierungen, vorzugsweise von 1 bis 100 mg, besonders bevorzugt von 3 bis 30 mg und am meisten bevorzugt von 5 bis 10 mg pro kg Körpergewicht verabreicht.

Weiterhin ist bevorzugt, daß nach der erstmaligen Verabreichung der Peptide, d. h. der Erstvakzinierung, mindestens noch eine zweite Vakzinierung und besonders bevorzugt noch mindestens eine dritte Vakzinierung durchgeführt wird. Bei der zweiten und den gegebenenfalls folgenden Vakzinierungen werden vorzugsweise die bereits zur Erstvakzinierung verwendeten Peptide, komplette GAD oder/und ein die Sequenz der Peptide enthaltender Teil davon eingesetzt. Bei einer Mehrfachvakzinierung sind die Intervalle zwischen den einzelnen Vakzinierungen vorzugsweise jeweils von 5 bis 25 Tagen, besonders bevorzugt von 7 bis 14 Tagen.

Weiter soll die Erfindung durch die folgenden Beispiele in Verbindung mit den Abb. 1, 2, 3A, 3B und 3C erläutert werden.

Abb. 1 zeigt autoreaktive Aminosäuresequenzen gemäß EP 95 100 764.0,

Abb. 2 zeigt weitere autoreaktive Aminosäuresequenzen gemäß EP 95 100 764.0,

Abb. 3A zeigt das Ergebnis eines Peptid-Screeningassays der T-Zelllinien R.B. und M.C. mit rekombinanter humaner GAD bzw. Peptidpools,

Abb. 3B zeigt das Ergebnis eines Proliferationsassays mit der T-Zelllinie R.B. mit Einzelpeptiden aus rGAD und

Abb. 3C zeigt das Ergebnis eines Proliferationsassays mit der T-Zelllinie M.C. mit Einzelpeptiden aus rGAD.

BEISPIEL 1

Etablierung von GAD-spezifischen T-Zelllinien

1. Primärstimulation

Durch Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation werden aus EDTA-Blut von Typ I-Diabetikern die peripheren Blut-Lymphozyten (PBLs) gewonnen. Die Zellen werden 2 mal in RPMI-Medium gewaschen und dann in einem Kulturmedium, bestehend aus RPMI 1640, 5% Humanserum, 2 mM Glutamin und 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, aufgenommen. Pro Napf einer 96 Napf Rundboden-Platte werden 100 µl Zellsuspension, entsprechend 100000 Zellen, eingesät. Danach erfolgt die Zugabe von rekombinanter humaner GAD 65 kd (rGAD), die im Baculovirus-System exprimiert wurde, in einer Endkonzentration von 3 bis 5 µg/ml. Die Zellen werden 3—4 Tage im Blutschrank bei 37°C/7% CO₂ inkubiert. Nach diesem Zeitraum erfolgt Zugabe von 100 µl IL-2 (5 U/ml). Nach weiteren 3—4 Tagen werden von allen Kulturansätzen 100 µl abgesaugt und wiederum 100 µl IL-2 (5 U/ml) zugegeben. Dies wird alle 3—4 Tage wiederholt.

2. Restimulation

Am Tag 14 nach dem Beginn der Primärstimulation erfolgt die erste Restimulation. Hierfür wird im Vergleich zur Primärstimulation die doppelte Anzahl von autologen PBLs mittels Ficoll isoliert und in Kulturmedium auf eine Zellkonzentration von 2×10^6 /ml eingestellt. Eine Hälfte dieser Stimulatorzellen wird mit dem Antigen rGAD (Endkonzentration 3 bis 5 µg/ml) für 2 Stunden/37°C/7% CO₂ inkubiert (Antigen-Pulse). Die andere Hälfte wird unter gleichen Bedingungen ohne Antigen, nur mit Kulturmedium inkubiert. Anschließend werden alle Stimulatorzellen mit 4000 rad bestrahlt. Die Stimulatorzellen werden dann in 96 Napf Rundboden-Platten verteilt (je 100000 Zellen/Napf) und zwar so, daß immer ein Napf mit Antigen enthaltenden Stimulatorzellen benachbart zu einem Loch mit Stimulatorzellen ohne Antigen zu liegen kommt.

Anschließend erfolgt die Präparation der T-Zellen aus den Primärstimulationsansätzen. Hierfür werden die Überstände aus den Primärstimulationsansätzen abgesaugt und die Zellen in den Platten zweimal mit je 100 µl Waschmedium (Dulbeccos Modified Eagle Medium = DMEM) gewaschen. Dazwischen werden die Zellen in den Platten bei 400 g zentrifugiert. Anschließend werden die Zellen in je 100 µl Kulturmedium aufgenommen und je 50 µl auf zwei benachbarte Näpfe der Restimations-Platte verteilt. Auf diese Weise werden die T-Zellen in einem Napf mit Antigen inkubiert und im benachbarten Napf ohne Antigen kann die Antigen-Spezifität der Restimulation kontrolliert werden.

Ab dem 2. oder 3. Tag nach dem Beginn der Restimulation kann die Proliferation mikroskopisch beurteilt werden. Dabei werden nur solche Mikrokultur-Pärchen als relevant angesehen, bei denen nur im Napf mit Antigen-Anwesenheit Proliferation erfolgt. Ab Tag 4 wird wiederum zu jedem Kultur-Napf 100 µl IL-2 (5 U/ml) zugegeben. Bis zum Tag 14 wird alle 3—4 Tage ca. 50% des Kulturmediums gegen IL-2 (5 U/ml) ausgetauscht.

Bei gutem Wachstum werden die Kulturen auf mehrere 96er Näpfe aufgeteilt. Bei späteren Restimulationen kann auch in größere Näpfe aufgeteilt werden. Alle 2 Wochen erfolgt eine erneute Restimulation nach der oben beschriebenen Methode. Ab der 3. Restimulation wird die Spezifität der Mikrokulturen in einem Proliferationstest ermittelt.

3. Proliferationstest mit rekombinanter humaner GAD 65 kd

Alle Tests werden mindestens in Doppel-Ansätzen durchgeführt.

a) Stimulator-Zellen:

Als Stimulatorzellen (APC) werden autologe PBLs oder in den HLA-Klasse II Antigenen identische PBLs

eines normalen Spenders verwendet. Die PBLs werden in einer Zahl von 100000 pro Loch einer 96 Napf-Platte verteilt und mit rGAD in einer Endkonzentration von 3 bis 5 µg/ml versetzt. In Kontrollansätzen wird statt Antigen ein gleiches Volumen an Medium vorgegeben. Nach Inkubation von 2 h bei 37°C und 7% CO₂ werden die Stimulatorzellen mit 4000 rad bestrahlt.

5 b) T-Zellen:

Die verwendeten T-Zellen stammen immer aus der Abschlußphase einer Restimulationsperiode. Sie werden 3 mal mit DMEM von Antigen und IL-2-freigewaschen und mit 6000 bis 10000 Zellen/96er Napf verteilt.

10 Nach 3—4 Tagen bei 37°C/7% CO₂ erfolgt die Zugabe von 1 µCi ³H-Thymidin und weitere Inkubation für 16—20 Stunden. Danach erfolgt das Übertragen der Zellen auf einen Glasfaserfilter mittels eines Zell-Ernte Gerätes und die Bestimmung der eingebauten Radioaktivität im β-Zählgerät. Die Proliferationsaktivität der T-Zelllinien wird mittels eines Stimulationsindex (SI) ausgedrückt. Dies ist der Quotient aus den cpm in Anwesenheit von rGAD dividiert durch die cpm in den Kontrollansätzen ohne Antigen. Abb. 3A (Säule rGAD) zeigt ein typisches Ergebnis eines Proliferationstests mit rGAD und den Linien R.B. und M.C.

15 4. Proliferationstest mit Peptiden, die aus der H-GAD 65 kd Sequenz abgeleitet sind

T-Zelllinien, die über mindestens 4 Restimulationsrunden expandiert wurden und mit rGAD im Proliferationstest reagierten, wurden zusätzlich mit überlappenden Peptiden der rGAD getestet. Diese Experimente haben 20 zum Ziel, die von den T-Zellen erkannten Epitope der rGAD zu definieren. Dazu werden zunächst sich überlappende 20 mer Peptide der rGAD synthetisiert (Überlappungsbereich 10 Aminosäuren, insgesamt 59 verschiedene Peptide).

Jeweils 4—5 dieser Peptide werden zu einem Pool vereinigt und in einer Endkonzentration von 5 µg/ml zu den Stimulatorzellen gegeben (Präparation der Stimulatorzellen wie unter Abschnitt 3a beschrieben).

25 Danach erfolgt die Zugabe von 6000-20.000 T-Zellen pro Mikrokultur-Napf. Das weitere Verfahren ist analog dem unter Abschnitt 3b beschriebenen.

Abb. 3A zeigt die Ergebnisse dieses Peptid-Screeningassays. Die T-Zelllinie R.B. reagiert mit dem Peptidpool, der die rGAD-Sequenzabschnitte 46—115 enthält, während die T-Zelllinie M.C. Peptide aus dem Sequenzabschnitt 216—285 erkennt. In Abb. 3B bzw. 3C sind die Reaktivitäten der T-Zelllinie R.B. bzw. M.C. mit den 30 Einzelpeptiden des jeweiligen Peptidpools dargestellt. Die Linie R.B. reagiert ausschließlich mit dem Peptid p86—105, während die Linie M.C. für das Peptid p246—265 spezifisch ist. Bei diesen Proliferationstests wurden die Peptide in einer Konzentration von 3 µg/ml eingesetzt.

Beispiel 2

35 Bestimmung des Subtyps von MHC-Molekülen, die den T-Zelllinien R.B. und M.C. autoreaktive Peptide präsentieren

Die Versuchsdurchführung erfolgte analog dem Beispiel 1.4. Als Antigen-präsentierende Zellen wurden 40 allerdings keine autologen PBLs verwendet, sondern Epstein Barr Virus transformierte B-Zellen mit definierten MHC-Allelen (sogenannte homozygote Typisierungszelllinien). Diese wurden so ausgewählt, daß nur eine teilweise Übereinstimmung mit den MHC-Klasse II Molekülen des Spenders der T-Zelllinien gegeben war, z. B. Identität in den DR-Allelen, Nichtidentität bezüglich der DQ-Allele. In Abweichung vom beschriebenen Beispiel 1.4 wurden die Peptide nach dem Antigenpuls ausgewaschen, um eine Autopräsentation durch die T-Zellen zu vermeiden.

45 Die Ergebnisse dieses Tests sind in Tabelle 1 dargestellt. Die T-Zellproliferation ist als Stimulationsindex (SI) ausgedrückt.

Das Ergebnis dieser Analyse ist bei der T-Zelllinie R.B. eindeutig. Nur wenn die Antigen-präsentierenden Zellen das Peptid p86—106 in Assoziation mit DRB1*0101 präsentieren, erfolgt eine Stimulation der T-Zellen. 50 Andere DR-Allele können das Peptid nicht präsentieren, eine Beteiligung des DQ-Alleles DQB1*0501 konnte ausgeschlossen werden (siehe Ergebnis mit den antigenpräsentierenden Zellen MZ070782). Somit ist DRB1*0101 das Restriktionselement für die T-Zelllinie R.B. Für die T-Zelllinie M.C. konnte das Restriktionselement durch diese Art der Analyse nicht im Detail aufgeklärt werden, da das DR-Allel DRB1*1501 und das DQ-Allel DQB1*0602 in der kaukasischen Bevölkerung eng gekoppelt vorliegen. Die Analyse ergab eine 55 Präsentation des Peptids entweder über die DR-Allele DRB1*1501 bzw. 1601 oder über das DQB1 0602 Allel.

Tabelle 1

APC	DRB1* :DQB1*	kein Antigen (CPM)	rGAD (SI)	T-Zelllinienproliferation Peptid 86-105 (SI)	246-265 (SI)
R.B. T-Zelllinie					
PBMC	0101/0401 :0501/0302	898	56	28	
JESTHOM	0101 :0501	840	-	20	
HOM2	0101 :0501	215	-	118	
YAR	0402 :0302	2859	-	-	
MZ070782	0102 :0501	3000	-	-	
PE117	0404 :0302	6238	-	-	
DEU	0401 :0301	2182	-	-	
M.C. T-Zelllinie					
PBMC	1501/1302 :0602/0604	864	32	28	
HHKB	1301 :0603	749	-	-	
KAS011	1601 :0502	961	-	-	
OMW	1301 :0603	792	-	-	
E4181324	1502 :0601	896	-	34	
WT47	1302 :0604	526	-	-	
WT8	1501 :0602	1079	11	41	
HO31	1302 :0604	1300	-	-	
EA	1501 :0602	3298	13	12	

Patentansprüche

1. Peptid oder Peptid-Derivat, umfassend:

(a) die Aminosäuresequenz (I)

D-V-N-Y-A-F-L-H-A-T-D-L-L-P-A-C-D-G-E-R,

(b) die Aminosäuresequenz (II)

S-N-M-Y-A-M-M-I-A-R-F-K-M-F-P-E-V-K-E-K,

(c) die Aminosäuresequenz (III)

N-W-E-L-A-D-Q-P-Q-N-L-E-E-I-L-M-H-C-Q-T,

(d) die Aminosäuresequenz (IV)

T-L-K-Y-A-I-K-T-G-H-P-R-Y-F-N-Q-L-S-T-G,

(e) die Aminosäuresequenz (V)

P-R-Y-F-N-Q-L-S-T-G-L-D-M-V-G-L-A-A-D-W,

(f) die Aminosäuresequenz (VI)

T-Y-E-I-A-P-V-F-V-L-L-E-Y-V-T-L-K-K-M-R,

(g) Teilbereiche der in (a), (b), (c), (d), (e) oder/und (f) dargestellten Aminosäuresequenzen mit einer Länge von mindestens 6 Aminosäuren oder/und

(h) Aminosäuresequenzen, die eine im wesentlichen äquivalente Spezifität oder/und Affinität der Bindung an MHC-Moleküle wie die in (a), (b), (c), (d), (e), (f) oder/und (g) dargestellten Aminosäuresequenzen zeigen.

2. Peptid oder Peptid-Derivat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Länge von mindestens 8 Aminosäuren aufweist.

3. Peptid oder Peptid-Derivat nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Länge von mindestens 10 Aminosäuren aufweist.

4. Peptid oder Peptid-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Länge von bis zu 25 Aminosäuren aufweist.

5. Peptid oder Peptid-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Markierungsgruppe trägt.

6. Peptidmimetikum, dadurch gekennzeichnet, daß es eine im wesentlichen äquivalente Spezifität oder/und Affinität der Bindung an MHC-Moleküle wie ein Peptid oder Peptid-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 5 aufweist.

7. Komplex, der mindestens ein Peptid oder Peptid-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder ein Peptidmimetikum nach Anspruch 6 umfaßt, das an ein MHC-Molekül oder ein peptidbindendes Derivat eines MHC-Moleküls gebunden ist.

8. Komplex nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß er ein MHC-Klasse II-Molekül oder ein peptidbindendes Derivat davon umfaßt.

9. Komplex nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das MHC-Klasse II-Molekül den Typ DR1, DR2 oder DQ6 aufweist.

10. Komplex nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das MHC-Klasse II-Molekül den Subtyp DR B1 0101, DR B1 1501, DR B1 1502, DR B1 1601 oder DQ B1 0602 aufweist.

11. Komplex nach einem der Ansprüche 7 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß er ein rekombinantes MHC-Molekül oder ein peptidbindendes Derivat davon umfaßt.

12. Komplex nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß er ein lösliches peptidbindendes Derivat eines MHC-Moleküls umfaßt.

13. Komplex nach einem der Ansprüche 7 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß er eine Markierungsgruppe trägt.

14. Komplex nach einem der Ansprüche 7 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß er mindestens 2 MHC-Moleküle oder MHC-Molekül-derivate enthält, die über kovalente oder nichtkovalente Wechselwirkungen assoziiert sind.

15. Komplex nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß er durch chemische Kopplungsreagenzien quervernetzte Peptid-MHC-Molekül-Komplexe enthält.

16. Komplex nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß er durch eine oligomerisierte Peptidkomponente mit mehreren MHC-bindenden Bereichen vernetzte MHC-Moleküle oder MHC-Molekül-derivate enthält.

17. Komplex nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß er durch Antikörper vernetzte Peptid-MHC-Molekül-Komplexe enthält.

18. Pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Peptid oder Peptid-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 5, ein Peptidmimetikum nach Anspruch 6 oder/und einen Komplex nach einem der Ansprüche 7 bis 17 als aktive Komponente gegebenenfalls in Kombination mit pharmazeutisch üblichen Zusatzstoffen enthält.

19. Zusammensetzung nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß sie weiterhin eine akzessorische stimulierende Komponente umfaßt.

20. Zusammensetzung nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß die akzessorische stimulierende Komponente ausgewählt ist aus Cytokinen oder/und dem Oberflächenantigen B7.

21. Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 18 bis 20 zur Herstellung eines Mittels für die Diagnose von Erkrankungen oder einer Prädisposition für Erkrankungen, die das Immunsystem beeinflussen, oder von Tumorerkrankungen oder einer Prädisposition für Tumorerkrankungen.

22. Verwendung nach Anspruch 21 zur Herstellung eines Mittels für die Diagnose von Autoimmunerkrankungen oder einer Prädisposition für Autoimmunerkrankungen.
23. Verwendung nach Anspruch 21 oder 22 zur Herstellung eines Mittels für die Diagnose von Diabetes oder einer Prädisposition für Diabetes.
24. Verfahren zur Bestimmung einer spezifischen T-Zell-Subpopulation, dadurch gekennzeichnet, daß man eine T-Zellen enthaltende Probe mit einem Peptid oder Peptid-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 5, einem Peptidmimetikum nach Anspruch 6 oder/und einem Komplex nach einem der Ansprüche 7 bis 17 in Kontakt bringt und die Reaktion von T-Zellen in der Probe mit dem Peptid oder Komplex bestimmt.
25. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß man die Reaktion der T-Zellen mit einem fluoreszenzmarkierten Peptid oder Komplex durch FACS-Analyse bestimmt.
26. Verfahren nach Anspruch 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, daß man vor und/oder nach dem Kontakt der T-Zellen mit dem Peptid oder dem Komplex eine Selektion auf präaktivierte T-Zellen durchführt.
27. Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 18 bis 20 zur Herstellung eines Mittels für die Therapie oder Prävention von Erkrankungen, die das Immunsystem beeinflussen.
28. Verwendung nach Anspruch 27 zur Herstellung eines Mittels für die Therapie oder Prävention von Autoimmunerkrankungen.
29. Verwendung nach Anspruch 27 oder 28 zur Herstellung eines Mittels für die Therapie oder Prävention von Diabetes.
30. Verwendung eines Peptids oder Peptid-Derivats nach einem der Ansprüche 1 bis 5, eines Peptidmimetikums nach Anspruch 6 oder eines Komplexes nach einem der Ansprüche 7 bis 17 zur Herstellung eines Antigens, insbesondere eines Immunogens oder Tolerogens.
31. Verfahren zur Isolierung einer spezifischen T-Zell-Subpopulation, dadurch gekennzeichnet, daß man eine T-Zellen enthaltende Probe mit einem Peptid oder Peptid-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 5, einem Peptidmimetikum nach Anspruch 6 oder einem Komplex nach einem der Ansprüche 7 bis 17 in Kontakt bringt, die mit dem Peptid oder Komplex reagierenden T-Zellen identifiziert und gegebenenfalls von anderen T-Zellen abtrennt.
32. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß man vor oder/und nach dem Kontakt der T-Zellen mit dem Peptid oder dem Komplex eine Selektion auf präaktivierte T-Zellen durchführt.
33. Verwendung von nach dem Verfahren gemäß Anspruch 31 isolierten T-Zellen oder Teilstrukturen davon zur Herstellung eines Antigens.
34. Verwendung nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß die T-Zellen oder Teilstrukturen davon in den Patienten, aus dem sie ursprünglich stammen, reinjiziert werden.
35. Verwendung nach Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, daß inaktivierte T-Zellen reinjiziert werden.
36. Verwendung nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, daß teilungsfähige T-Zellen reinjiziert werden.
37. Antikörper gegen ein Peptid oder Peptid-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 5, ein Peptidmimetikum nach Anspruch 6 oder einen Komplex nach einem der Ansprüche 7 bis 17, erhältlich durch Immunisierung mit dem Peptid, Peptid-Derivat, Peptidmimetikum oder Komplex und Gewinnung eines durch die Immunisierung erzeugten Antikörpers.
38. Anti-idiotypischer Antikörper gegen einen Antikörper nach Anspruch 37, erhältlich durch Immunisierung mit dem Antikörper gegen das Peptid, Peptid-Derivat oder Peptidmimetikum oder den Komplex und Gewinnung eines durch die Immunisierung erzeugten anti-idiotypischen Antikörpers.
39. T-Zelle, die mit einem Peptid oder Peptid-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 3, einem Peptidmimetikum nach Anspruch 6 oder einem Komplex nach einem der Ansprüche 7 bis 17 reagiert.
40. Verwendung von Peptiden aus Glutamin-Decarboxylase (GAD), davon abgeleiteten Peptid-Derivaten oder Peptidmimetika zur Herstellung eines Arzneimittels, das bei Verabreichung an Diabetes-Patienten zur Ausbildung einer Immuntoleranz führt.
41. Verwendung nach Anspruch 40, dadurch gekennzeichnet, daß man die Peptide, Peptid-Derivate oder Peptidmimetika in einer Dosis von 3 bis 30 mg pro kg Körpergewicht verabreicht.
42. Verwendung nach Anspruch 40 oder 41, dadurch gekennzeichnet, daß nach Verabreichung der Peptide, Peptid-Derivate oder Peptidmimetika mindestens noch eine zweite Vakzinierung durchgeführt wird.
43. Verwendung nach einem der Ansprüche 40 bis 42, dadurch gekennzeichnet, daß man bei der zweiten und gegebenenfalls folgenden Vakzinierungen die bereits zur Erstvakzinierung verwendeten Peptide, Peptid-Derivate oder Peptidmimetika komplette GAD oder/und einen die Sequenz der Peptide enthaltenden Teil davon einsetzt.
44. Verwendung nach Anspruch 43, dadurch gekennzeichnet, daß die Vakzinierungen jeweils in Intervallen von 7 bis 14 Tagen erfolgen.
45. Verwendung nach einem der Ansprüche 40 bis 44, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Mischung von unterschiedlichen Peptiden, Peptid-Derivaten oder Peptidmimetika verabreicht.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

Abb. 1

I-L-I-K-C-D-E-R-G-K-M-I-P-S
L-G-I-G-T-D-S-V-I-L-I-K-C-D
L-A-F-L-Q-D-V-M-N-I-L-L-Q-Y
Y-D-L-S-Y-D-T-G-D-K-A-L-Q-C

Abb. 2

V-S-Y-Q-P-L-G-D-K-V-N-F-F-R

L-A-A-D-W-L-T-S-T-A-N-T-N-M

L-L-Y-G-D-A-E-K-P-A-E-S-G-G

V-N-Y-A-F-L-H-A-T-D-L-L-P-A

L-L-Q-Y-V-V-K-S-F-D-R-S-T-K

F-T-Y-E-I-A-P-V-F-V-L-L-E-Y

L-E-Y-V-T-L-K-K-M-R-E-I-I-G

N-M-Y-A-M-M-I-A-R-F-K-M-F-P

K-I-W-M-H-V-D-A-A-W-G-G-G-L

W-G-G-G-L-L-M-S-R-K-H-K-W-K

E-G-Y-E-M-V-F-D-G-K-P-Q-H-T

R-Y-F-N-Q-L-S-T-G-L-D-M-V-G

W-L-T-S-T-A-N-T-N-M-F-T-Y-E

T-A-N-T-N-M-F-T-Y-E-I-A-P-V

L-V-S-A-T-A-G-T-T-V-Y-G-A-F

Y-I-P-P-S-L-R-T-L-E-D-N-E-E

V-I-S-N-P-A-A-T-H-Q-D-I-D-F

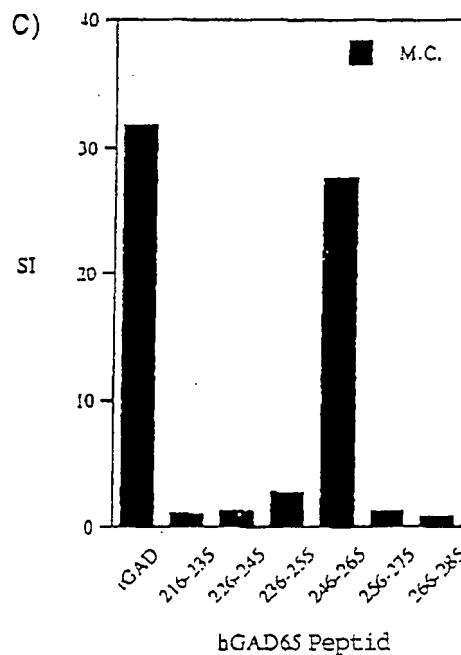
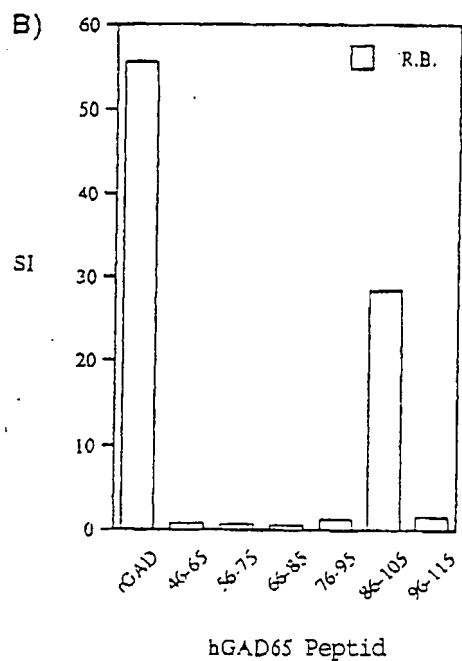
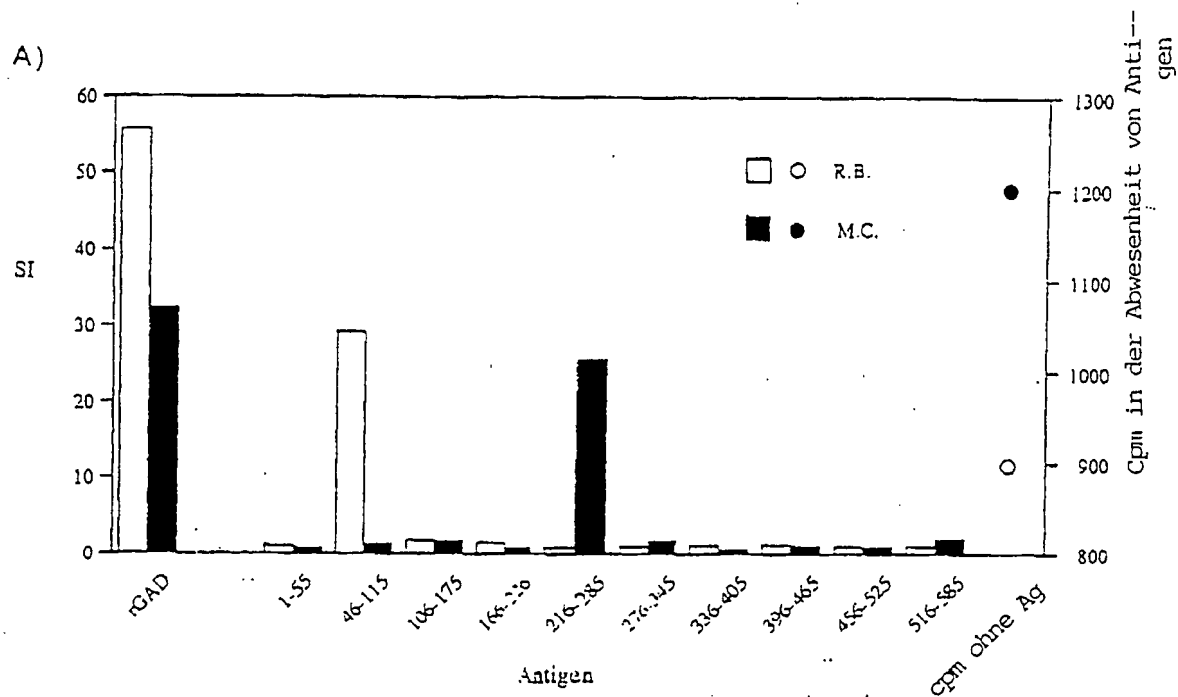


Abb. 3

AUTOREACTIVE PEPTIDES FROM HUMAN GLUTAMIC ACID-DECARBOXYLASE (GAD)

DESCRIPTION

[0001] The present invention concerns peptides which cause an autoimmune reaction, complexes of these peptides with molecules of the major histocompatibility complex (MHC), T cell subpopulations which react with the peptides or/and the complexes of peptides and MHC molecules as well as diagnostic and therapeutic applications of these compounds.

[0002] The elucidation of the molecular relationship in the development of autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis and juvenile diabetes (IDDM) has progressed very rapidly in recent years and concrete applications for the early diagnosis and a causal therapy of these diseases is recognizable.

[0003] Today it is regarded as certain that environmental factors also play a role in the development of these diseases in addition to a genetic disposition. Of the level of genetic risk factors only a few alleles of the MHC class II antigens are closely associated with this disease for example in the case of IDDM. Thus it is possible to define a risk group for IDDM by analysing these alleles (cf. e.g. Thomson et al., *Am. J. Hum. Genet.* 43 (1988), 799-816 or Todd et al., *Nature* 329 (1987), 599-604).

[0004] Environmental factors involved in the development of IDDM are probably exogenous peptide sequences that acts as immunogen. Among others viral antigens which have partial homologies to endogeneous structures have been discussed in this connection. Under particular circumstances and in particular in the postnatal phase antigens taken up via the fool such as bovine serum albumin can induce an immune response which, due to homologies to endogeneous structures, can start an autoaggressive process.

[0005] Typical for the course of the disease in case of IDDM is the progressive destruction of pancreas β cells by cytotoxic lymphocytes. This process begins a long time before a recognizable disturbance of glucose metabolism. When the manifestation of diabetes is recognizable already over 90% of the β cells are destroyed. It would therefore be extremely important to detect these autoaggressive T cells at an early stage in persons at risk in order to provide the affected individuals with a causal therapy.

[0006] Nowadays it is regarded as certain that the destruction of endogenous tissue in autoimmune diseases progresses very slowly at the start. In the initial stage of this process the autoaggressive T cells probably recognize only one or a few autoantigens. Publications by Kaufman et al. (*Nature* 368 (1993), 69-72) and Tisch et al. (*Nature* 368 (1993), 72-78) on an animal model (NOD mouse) for type I diabetes have shown that in the spontaneously occurring diabetes of this mouse strain the initial autoimmune reaction mediated by T cells is directed against glutamic acid decarboxylase. In this process only one to 2 epitopes of the C terminus of glutamic acid decarboxylase (GAD) are recognized initially in the NOD mouse. At this time no changes in the glucose metabolism can yet be determined—as described above—whereas in contrast a perinsulinitis is already detectable. The spectrum of the peptides of GAD recognized by the autoaggressive T cells does not expand

until later in the course of the disease. After the diabetes becomes manifest pre-activated T cells against other islet cell antigens are also detectable e.g. peripherin, heat shock protein HSP 65 and carboxypeptidase H.

[0007] There are indications that also in humans the immune response towards GAD is causally associated with the development of type I diabetes. Thus for example autoantibodies against GAD can be detected in over 80% pre-diabetics whereby the etiological role of these autoantibodies is, however, estimated to be low. Rather it is assumed that in the case of type I diabetes there is a progressive destruction of pancreas B cells by T lymphocytes. These T lymphocytes directed against GAD have already been detected by several research groups (Harrison et al., *J. Clin. Invest.* 89 (1992), 1161; Honeyman et al., *J. Exp. Med.* 177 (1993), 535). The autoantibodies found by these groups reacted with a peptide fragment of the GAD 67 kd molecule composed of amino acids 208 to 404.

[0008] Autoimmunely reacting polypeptides from the human GAD 65 kd molecule are disclosed in EP-A-0 519 469. These polypeptides have the amino sequence:

[0009] X-P-E-V-K-(T or E)-K-Z

[0010] in which X is an optional sequence selected from 1 to 10 amino acids and Z is an optional sequence selected from 1 to 8 amino acids.

[0011] Autoreactive peptide sequences from the human GAD 65 kd are proposed in the European Patent Application No. 95 100 764.0 comprising:

[0012] (a) the amino acid sequence

[0013] G-M-A-A-L-P-R-L-I-A-F-T-S-E-H-S-H-
F-S-L-K-K-G-A-A,

[0014] (b) the amino acid sequence

[0015] E-R-G-K-M-I-P-S-D-L-E-R-R-I-L-E-A-K-
Q-K,

[0016] (c) one of the amino acid sequences shown in FIG. 1 or 2,

[0017] (d) partial regions of the amino acid sequences shown in (a), (b) or/and (c) with a length of at least 6 amino acids or/and

[0018] (e) amino acid sequences which have an essentially equivalent specificity or/and affinity of binding to MHC molecules as the amino acid sequences shown in (a), (b), (c) or/and (d).

[0019] An object of the present invention was to provide new autoreactive peptides that react with T cells from type I diabetics and especially with T cells from recently discovered type I diabetics and thus define early autoepitopes.

[0020] This object is achieved by peptides, peptide derivatives or molecules binding analogously which are suitable for the detection, isolation, multiplication, anergization or/and elimination of autoreactive T cells. One subject matter of the invention is thus a peptide or peptide derivative comprising:

[0021] (a) the amino acid sequence (I)

[0022] D-V-N-Y-A-F-L-H-A-T-D-L-L-P-A-C-D-
G-E-R,

- [0023] (b) the amino acid sequence (II)
- [0024] S-N-M-Y-A-M-M-I-A-R-F-K-M-F-P-E-V-K-E-K,
- [0025] (c) the amino acid sequence (III)
- [0026] N-W-E-L-A-D-Q-P-Q-N-L-E-E-I-L-M-H-C-Q-T,
- [0027] (d) the amino acid sequence (IV)
- [0028] T-L-K-Y-A-I-K-T-G-H-P-R-Y-F-N-Q-L-S-T-G,
- [0029] (e) the amino acid sequence (V)
- [0030] P-R-Y-F-N-Q-L-S-T-G-L-D-M-V-G-L-A-A-D-W,
- [0031] (f) the amino acid sequence (VI)
- [0032] T-Y-E-I-A-P-V-F-V-L-L-E-Y-V-T-L-K-K-M-R,
- [0033] (g) the amino acid sequence (VII)
- [0034] F-F-R-M-V-I-S-N-P-A-A-T-H-Q-D-I-D-F-L-I,
- [0035] (h) partial regions of the amino acid sequence shown in (a), (b), (c), (d), (e), (f) or/and (g) with a length of at least 6 amino acids or/and
- [0036] (i) amino acid sequences which have an essentially equivalent specificity or/and affinity of binding to MHC molecules as the amino acid sequences shown in (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g) or/and (h).
- [0037] The amino acid sequences (I) to (VII) correspond to the amino acid residues 86-105 (I), 246-265 (II), 146-165 (III), 166-185 (IV), 176-195 (V), 206-225 (VI) and 556-575 of human GAD 65.
- [0038] It was surprisingly found that peptides which correspond to amino acid sequences (I) to (VII) of human GAD 65 exhibited a specific reaction with T cell subpopulations which were isolated from recently discovered type I diabetics. Thus the peptide according to the invention are early autoepitopes which can be used for a very early diagnosis of type I diabetes. In addition the peptides according to the invention can also be used therapeutically by inactivating the T cell population that is reactive to the peptides.
- [0039] A particularly preferred peptide is a partial peptide of peptide (VII) having the amino acid sequence SNPAATHQDIDFLI (VIIa) corresponding to the amino acid residues 562-575 of human GAD 65. By shortening analyses it was found that this peptide represents the minimal stimulatory sequence of the peptide (VII) especially with regard to its C-terminus. When it was shortened by only a single amino acid at the C-terminus (isoleucine) it was found that the peptide nearly completely lost its ability to stimulate.
- [0040] Preferred examples of T cell subpopulations with which the peptides according to the invention of amino acid sequences (I) or/and (II) are the T cell lines R.B. and M.C. or T cells of an equivalent binding specificity.
- [0041] The amino acid sequences (I) to (VII) are partial regions from the 65 kd isoform of human glutamic acid decarboxylase (GAD) the complete amino acid sequence of which has been described by Bu et al., (Proc. Natl. Acad.

Sci. USA 89 (1992), 2115 ff.). The amino acid sequences (I) to (VII) were found by setting up T cell lines from the peripheral blood of type I diabetics and subsequently stimulating them in vitro with recombinant human GAD and testing these T cell lines in a proliferation assay with synthetic peptide sequences which were derived from the human GAD sequence.

[0042] The peptides according to the invention can be produced by known synthesis procedures by means of chemical methods or by genetic engineering by cloning and expressing a DNA sequence coding for this peptide in a suitable host cell in particular *E. coli*.

[0043] In addition the present invention also encompasses peptides with partial regions of the stated specific amino acid sequences (I), (II), (III), (IV), (V), (VI) or (VII) which have a length of at least 6 amino acids preferably of at least 8 amino acids particularly preferably of at least 10 amino acids and most preferably of at least 15 amino acids. The minimum length of a peptide according to the invention is determined by its ability to recognize a MHC molecule, to bind specifically to it and to react with the corresponding T cell receptor.

[0044] The maximum length of the sections in a peptide according to the invention derived from GAD and binding to MHC is preferably 100 amino acids particularly preferably 50 amino acids and most preferably 25 amino acids.

[0045] In addition to peptides with the amino acid sequences (I) to (VII) or partial regions thereof the invention also concerns other peptides with amino acid sequences which have an essentially equivalent specificity or/and affinity of binding to MHC molecules as the aforementioned sequences and are preferably derived from the amino acid sequences (I) to (VII) by substitution, deletion or insertion of individual amino acid residues or short section of amino acid residues or modified substances bind analogously.

[0046] The present invention in particular also concerns peptide variants whose sequences do not completely correspond with the aforementioned amino acid sequences but which only have identical or closely related "anchor positions". The term "anchor position" in this connection denotes an essential amino acid residue for binding to a MHC molecule in particular to a MHC molecule of the classes DR1, DR2, DR3, DR4 or DQ. The anchor position for the DRB1*0401 binding motif are for example stated in Hammer et al., Cell 74 (1993), 197-203. Such anchor positions are conserved in peptides according to the invention or are optionally replaced by amino acid residues with chemically very closely related side chains (e.g. alanine by valine, leucine by isoleucine and vice versa). The anchor position in the peptides according to the invention can be determined in a simple manner by testing variants of the aforementioned specific peptides for their binding ability to MHC molecules. Peptides according to the invention are characterized in that they have an essentially equivalent specificity or/and affinity of binding to MHC molecules as the aforementioned peptides. The peptides derived from peptides of amino acid sequences (I) to (VII) preferably have a sequence homology of at least 30% particularly preferably of at least 50% and most preferably of at least 60% to the starting peptides or partial sequences thereof.

[0047] Examples of variants of the specifically stated peptides are the corresponding homologous peptide sections

from human GAD 67 the complete amino acid sequence of which has also been described by Bu et al., *Supra*.

[0048] The term "essentially equivalent specificity or/and affinity of binding to MHC molecules" also includes an improved binding specificity or/and affinity compared to the amino acid sequences (I) to (VII) which is especially found in the case of shortened peptides which has a length of preferably 8 to 15 amino acids.

[0049] In addition the present invention also encompasses peptide derivatives. This term includes peptides in which one or several amino acids have been derivatized by a chemical reaction. Examples of peptide derivatives according to the invention are in particular molecules in which the back-bone or/and reactive amino acid side groups e.g. free amino groups, free carboxyl groups or/and free hydroxyl groups have been derivatized. Specific examples of derivatives of amino groups are sulfonic acid or carboxylic acid amides, thiourethane derivatives and ammonium salts e.g. hydrochloride. Examples of carboxyl group derivatives are salts, esters and amides. Examples of hydroxyl group derivatives are O-acyl or O-alkyl derivatives. The term peptide derivative according to the invention in addition also includes those peptides in which one or several amino acids have been replaced by naturally occurring or non-naturally occurring amino acid homologues of the 20 "standard" amino acids. Examples of such homologues are 4-hydroxyproline, 5-hydroxylysine, 3-methylhistidine, homoserine, ornithine, β -alanine and 4-amino butyric acid.

[0050] Those peptides are in particular preferred which have an essentially equivalent specificity or/and affinity of binding to MHC molecules such as peptides with the amino acid sequences (I) to (VII) but which in contrast to these peptides do not cause an activation of T cells but rather produce an anergic state in T cells.

[0051] Polypeptides are encompassed by the present invention in which the MHC-binding peptide section is a component of a larger polypeptide unit in which the compound of MHC-binding peptides and the rest of the polypeptide unit preferably have a pre-determined breaking point e.g. a protease cleavage site.

[0052] A further subject matter of the present invention is a peptide or peptide derivative which carries a signal generating substance or a marker group e.g. a fluorescent marker group (e.g. rhodamine, phycoerythrin), digoxin, biotin, a radioactive group or a toxine group (e.g. ricine, choleratoxine etc.). The peptide can be used as a diagnostic agent for in vivo or in vitro (e.g. imaging) applications or as a therapeutic agent by coupling the peptide according to the invention with marker groups. In addition the peptide according to the invention can also for example be present in a cyclized form or in an oligomeric form in which the important sequences for binding to the MHC molecule are separated from one another by spacer regions.

[0053] The invention also concerns peptide mimetic substances which have an essentially equivalent specificity or/and affinity of binding to MHC molecules as the aforementioned peptides or peptide derivatives. Peptide mimetic substances or peptide mimetics are compounds which can replace peptides in their interaction with MHC molecules as compared to the native peptides have an increased metabolic stability, improved bioavailability and longer duration of

action. Methods for the production of peptide mimetics are described by Giannis and Kolter, "Angew. Chem." 105 (1993), 1303-1326, Lee et al., Bull. Chem. Soc. Jpn. 66 (1993), 2006-2010 and Dorsch et al., "Kontakte" (Darmstadt) (1993) (2), 48-56. Reference is made to the disclosure of these literature references with regard to the synthesis of peptide mimetic substances according to the invention.

[0054] A further subject matter of the present invention is a complex which includes at least one peptide according to the invention, peptide derivative or peptide mimetic and at least one MHC molecule or peptide-binding derivative of a MHC molecule. In this complex a peptide, peptide derivative or peptide mimetic with a binding constant of at least 10^{-7} /mol particularly preferably in the range of 10^{-8} - 10^{-9} /mol is bound to a MHC molecule or a peptide-binding derivative of a MHC molecule. Alternatively the peptide, peptide derivative or peptide mimetic can also be covalently be coupled to the MHC molecule e.g. by means of a photolinker or as a covalent genetic peptide-MHC fusion. Such a peptide-MHC fusion protein preferably contains a HLA-DR beta chain and an autoreactive peptide genetically fused to it. The complex particularly preferably contains a MHC class II molecule or a peptide-binding derivative thereof.

[0055] The MHC class II molecule is preferably of the DR type for example of the DR1, DR2, DR4 or DQ6 type. The MHC class II molecule is preferably of the DR1 type (subtype DRB1*0101), DR2 (subtype B1*1501, DR B1*1502, DR b1*1601 or Dr B5*0101), DR4 (subtype DR B1*0401) or DQ6 (subtype DQ B1*0602). The T cell line R.B. proliferates with the autoreactive peptide of amino acid sequence 86-105 of GAD 65 kd in the presence of the DR B1 allele 0101. The T cell line M.C. proliferates with the autoreactive peptide of amino acid sequence 246-265 of rGAD in the presence of the DR B1 allele 1501 or/and of the DQ B1 allele 0602. The DR B1 allele 0401 was identified as a restriction element for the autoreactive peptide with the amino acid sequence 556-575 of GAD.

[0056] The nucleotide sequences of genes coding for a MHC class molecule of the above subtype are published in Corell et al., (Mol. Immunol. 28 (1991), 533-543). Reference is hereby made to the content of this publication.

[0057] The term "peptide-binding derivative of a MHC molecule" includes fragments of MHC molecules which are produced by proteolytic cleavage of native MHC molecules or by recombinant DNA techniques and which have essentially retained their peptide-binding properties. This term is also to be understood to include fusion proteins which have yet a further polypeptide component in addition to the MHC part responsible for peptide binding.

[0058] The peptide-MHC complexes according to the invention are preferably produced by association of peptide-free MHC molecules or MHC molecule derivatives with the peptides, peptide derivatives or peptide mimetics according to the invention. The production of peptide-free MHC molecules can for example be carried by unfolding native MHC molecules in order to dissociate bound peptides and refolding the empty MHC molecules (see Dormair and McConnell, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990), 4134-4138 and WO91/14701).

[0059] On the other hand peptide-free MHC molecules can also be obtained by the recombinant production of MHC

molecules or derivatives thereof. Examples of this are the expression of MHC class II molecules in fibroblasts (Germain and Malissen, *Ann. Rev. Immunol.* 4 (1990), 281-315) and the expression of soluble MHC class II molecule derivatives without membrane anchors in CHO cells (Wetstein et al., *J. Exp. Med.* 174 (1991), 219-228, Buelow et al., *Eur. J. Immunol.* 23 (1990), 69-76) and by means of the baculovirus expression system in insect cells (Stern and Wiley, *Cell* 68 (1992), 465-477; Scheirle et al., *J. Immunol.* 149 (1992), 1994-1999). MHC class I molecules have also been expressed in CHO cells (Fahnestock et al., *Science* 258 (1992), 1658-1662) in insect cells (Jackson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992), 12117-12120; Malsam et al., *J. Biol. Chem.* 267 (1992), 23589-23595) and in fibroblasts (Mage et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992), 10658-10661).

[0060] The expression of peptide-free MHC molecules is also known in *E. coli* (Parker et al., *Mol. Immunol.* 29 (1992), 371-378; Zhang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992), 8403-8407; Garboczi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992), 3429-3433; Altman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993), 10330-10334). Reference is made to the technique for the recombinant expression of MHC molecules or MHC molecule derivatives described in these publications.

[0061] The MHC component of the complex according to the invention is preferably a recombinant MHC molecule or a peptide-binding derivative thereof and particularly preferably a soluble MHC molecule derivative in which the membrane anchor is partially or completely deleted.

[0062] In order to identify MHC molecules which present the autoreactive peptide according to the invention the antigen presenting cells of a donor are incubated with the peptide according to the invention in a labelled form in which bound peptides are preferably firstly associated by denaturing native MHC molecules. Subsequently the labelled MHC-peptide complexes can be immunoprecipitated with subtype-specific antibodies which are directed against frame work-specific determinants of the MHC molecules and are identified by the presence of the labelled peptides.

[0063] Alternatively EBV (Epstein-Barr virus) transformed B cells of the donor can be used as the antigen presenting cells.

[0064] The complexes according to the invention comprising a recombinant MHC molecule derivative can for example be produced by isolating DNA fragments for the soluble parts of the α and β chains of a MHC molecule e.g. a MHC-DR1, DR2 or DQ1 molecule by PCR in which cDNA from an EBV-transformed B cell line of a donor is used as a template which expresses the corresponding MHC molecule. In this step a purification aid e.g. an oligohistidine segment (e.g. a hexahistidine segment) is preferably introduced at the C terminus of the α and the β chain by appropriate selection of the PCR primer. The PCR products can be subsequently subcloned in *E. coli* and expressed as inclusion bodies. The inclusion bodies can be solubilized by known methods (cf. literature references for the expression of MHC molecules in *E. coli*, supra) and the MHC proteins can be purified by means of metal chelate affinity chromatography. Subsequently the α and β subunits are renatured in the presence of the peptide.

[0065] The peptide-MHC complex according to the invention can also carry a marker group as described above in which the marker group can be bound to the peptide component as well as to the MHC component of the complex by known methods.

[0066] A further subject matter of the present invention is an oligomerized peptide-MHC complex which contains at least 2 MHC molecules or MHC molecule derivatives which are associated by means of covalent or non-covalent interactions. Such an oligomerized peptide-MHC complex has the advantage over known (with regard to the MHC molecule) monomeric complexes of a higher affinity and thus an improved diagnostic or/and therapeutic efficacy.

[0067] In one embodiment of the present invention such an oligomerized complex can be produced according to known methods by covalent cross-linking of monomeric peptide/MHC molecule complexes by means of chemical coupling reagents e.g. N-succinimicyl-3(2-pyridylthio)propionate, 3-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester, maleimidohexanoyl-N-hydroxy-succinimide ester, bis(maleimidomethyl)ether, disuccinimidylsuberate, glutaraldehyde etc. Optionally individual amino acids of the peptide component or the MHC component can also be modified in such a way that special coupling reagents preferably attack at this site. Thus the introduction of additional cysteine or lysine residues by recombinant means in the protein component or by chemical synthesis in the case of the peptide component allows coupling via SH linkers or via amino groups.

[0068] In a further embodiment of the present invention the oligomerized peptide-MHC complex can be produced in such a way that the peptide component binding to the MHC molecule is used as an oligomer i.e. as a peptide molecule which contains at least 2 MHC-binding regions in which the sequences that are important for binding to the MHC molecules are separated from one another by spacer regions. These spacer regions are usually composed of 10-15 amino acids. One uses small hydrophilic amino acids e.g. glycine, alanine, serine, proline or combinations thereof. When peptide-free MHC molecules are renatured in the presence of these peptide oligomers these oligomerized complex according to the invention forms which contains the MHC molecules cross-linked by the oligomerized peptide component via non-covalent interaction.

[0069] In addition oligomerized peptide-MHC complexes can be produced by modification of MHC molecules produced by recombinant means. Thus during the construction of vectors for the expression of recombinant α or β chains of MHC class II molecules a gene segment can be cloned in preferably at the C terminus in each case which codes for an epitope that is recognized by an antibody. This antibody can be of the IgG type but preferably of the IgM type. The renatured monomeric peptide/MHC complexes are then incubated with an antibody that recognizes the introduced epitope so that non-covalently cross-linked immune complexes composed of several antibodies and several peptide-MHC complexes are produced. The introduction of DNA segments which code for an epitope into the DNA fragment coding for the α or β chain of the MHC molecule can be carried out by means of known molecular biological techniques e.g. by insertion into restriction sites or by site-directed mutagenesis.

[0070] The oligomerized peptide-MHC complex according to the invention contains a peptide which comprises the amino acid sequences (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII) or partial regions thereof or/and amino acid sequences derived therefrom or a peptide derivative or peptide mimetic thereof. The oligomerized complex can preferably be used as a diagnostic or therapeutic reagent for type I diabetes.

[0071] Thus the invention also concerns a pharmaceutical composition which contains a peptide, peptide derivative, peptide mimetic or/and a peptide-MHC complex as the active component optionally in combination with common pharmaceutical additives. The composition can in addition contain an accessory stimulating component e.g. cytokines such as IL-2 and IL-4 or/and the surface antigen B7 (Wyss-Coray et al., *Eur. J. Immunol.* 23 (1993), 2175-2180; Freeman et al., *Science* 262 (1993), 909-911) which can bind with the surface molecule CD-28 on a T cell. The presence of the accessory stimulating component has improved or/and modified the therapeutic action of the composition.

[0072] An additional subject matter of the present invention is the use of a pharmaceutical composition which contains a peptide, peptide derivative, peptide mimetic or/and peptide-MHC complex for the production of an agent for the diagnosis of diseases or a predisposition for diseases which influence the immune system or for the diagnosis of tumour diseases or a predisposition of tumour diseases in particular for the diagnosis of autoimmune diseases or a predisposition of autoimmune diseases e.g. diabetes type I or type II preferably diabetes type I.

[0073] Analogous diagnostic applications are, however, also possible for other autoimmune diseases. Examples of such autoimmune diseases are multiple sclerosis where reactive T cells against myelin basic protein or the proteolipid protein can be determined, rheumatoid arthritis where reactive T cells against collagen type II, cytokeratine and Hsp 65 can be determined, Basedow disease where reactive T cells against thyroid peroxidase can be determined.

[0074] In general a diagnostic application is possible for all diseases which influence the immune system such as e.g. also in the case of arteriosclerosis. In this case the disease has been found to be associated with an immune response against the heat shock protein Hsp 65 (Xu et al., *Lancet* 341, 8840 (1993), 255-259).

[0075] A further application is the diagnostic detection of T cells which react to tumour antigens. Examples of this are T cells against a melanoma-associated antigen MAGE 1 which has been isolated from melanoma patients (van der Bruggen et al., *Science* 254 (1991), 1643-1647). oligomerized complexes according to the invention can be used to already detect these T cells in a stage in which the tumour is not yet detectable by conventional methods due to a still too low a cell mass. In addition the detection of specifically reacting T cells can also be used to monitor an anti-tumour vaccination.

[0076] Hence a further subject matter of the present invention is a method for determining a specific T cell subpopulation which is characterized in that a sample containing T cells which is preferably derived from a body fluid e.g. whole blood is contacted with a peptide, peptide derivative, peptide mimetic or/and a complex according to the invention and the reaction of T cells with the peptide or complex is

determined. A specific reaction of T cells with the complex or the peptide can then for example be detected by an increased T cell proliferation which can be measured by the incorporation of radioactivity. On the other hand the reaction of T cells can also be determined directly by using a labelled peptide or complex. In this embodiment the peptide or complex is preferably used with a fluorescent labelled group coupled thereto. The evaluation can for example be carried out FACS analysis in which the T cells are coupled with a first fluorescent label which is coupled to a T cell-specific antibody and then with the peptide-MHC complex which is coupled to a second fluorescent label and the presence of double-labelled cells is determined by fluorographic analysis. In this manner a T cell subpopulation is determined which is characterized by its reactivity with a peptide or peptide derivative according to the invention or/and with a peptide-MHC complex according to the invention. Due to the low concentration of the specific T cell population in blood a selection for pre-activated T cells e.g. a selective enrichment of IL-2 receptor-positive T cells is preferably carried out as the first step of the procedure by incubation with IL-2 or/and by incubation with IL-2 receptor antibodies and subsequent separation of the antibody-binding cells for example with immune magnetic methods. On the other hand the selection for pre-activated cells can be first carried out after contact of the T cells with the peptide or the complex.

[0077] In a modification of this method it is also possible to determine the ratio of pre-activated autoreactive T cells i.e. T cells with the IL-2 receptor as a surface marker to non-activated autoreactive T cells i.e. T cells without the IL-2 receptor.

[0078] This method can be used especially to diagnose type I diabetes but also for other diseases which influence the immune system or for the diagnosis of a predisposition for such diseases.

[0079] A further subject matter of the present invention is the use of a pharmaceutical composition which contains a peptide, peptide derivative, peptide mimetic or/and a peptide-MHC complex for the production of an agent for the treatment or prevention of diseases which influence the immune system. For the therapeutic application of the peptides according to the invention or the peptide-MHC complex according to the invention it is for example possible to use peptides or peptide-MHC complexes coupled to toxins and on the other hand it is also possible to use peptides alone or as components of the complex which although enabling and binding to the T cell receptor do not cause an activation of the T cell i.e. have an anergizing effect.

[0080] The therapeutic action of such anergizing peptide analogues is based on the fact that the T cell receptor (TCR) must interact with a peptide which is presented by a MHC antigen of class I or class II in order to activate the T cell. In this connection amino acids in anchor positions of the peptide are in particular responsible for the binding to the MHC molecule whereas other amino acids in the peptide contribute to the interaction with TCR and thus cause a T cell stimulation. Peptide analogues can thus be produced by amino acid substitution in the peptides which, due to the presence of the anchor positions, still bind to the MHC molecule but on the other hand only cause a partial or no T cell activation (cf. e.g. Sloan-Lancaster et al., *Nature* 363

(1993), 156-159). Such peptide analogues can for example have the effect that the expression of particular surface molecules is up-regulated (e.g. IL-2 receptor, LFA-1) but that no proliferation or cytokine expression occurs. T cells which interact with such a peptide analogue pass into a so-called anergic state i.e. they can no longer proliferate even as a result of a subsequent regular stimulation with an-immunogenic peptide. This anergic state lasts for at least 7 days and can therefore be used therapeutically in the treatment of an autoimmune disease.

[0081] A further therapeutic aspect of the present invention is that the peptide or the complex of peptide and MHC molecule can be used as an antigen. Such an antigen can in this case act as an immunogen i.e. as an agent stimulating the immune response or as a tolerogen i.e. as an agent which causes an immune response. The use as an immunogen can for example be applied in the vaccination against tumour antigens. Instead of the whole tumour cells previously used for this purpose it is possible to inject tumour-specific peptides recognized by the T cells in a complex with the appropriate MHC molecule in particular in the form of an oligomerized complex in order to induce a T cell response against the tumour. In order to increase the immune stimulation this complex can also be administered in combination with additional stimulating substances. Cytokines such as IL2 or IL4 are for example suitable for this purpose which are optionally and preferably covalently linked to the peptide-MHC complex according to the invention. A further possibility is to associate the complex with accessory components for T cell activation in particular with surface molecules that are essential for antigen presenting cells e.g. the surface molecule B7.

[0082] A preferred therapeutic formulation is to incorporate the MHC molecules loaded with peptide into artificial vesicles e.g. lipid vesicles which can optionally carry further membrane-bound molecules such as B7 or/and immobilized cytokines.

[0083] A further subject matter of the present invention is the isolation of T cell subpopulations which react with a peptide or peptide-MHC complex according to the invention. In such a method a sample containing T cells which is for example derived from a body fluid which has previously been taken from a patient is contacted with a peptide according to the invention or a peptide-MHC complex according to the invention, the T cells reacting with the peptide or complex are identified and they are optionally separated from other T cells. Also in this case a selection for pre-activated T cells i.e. T cells with the IL2 receptor can preferably be carried out before or/and after contact of the T cells with the peptide or the complex.

[0084] In such a process the peptide or the peptide-MHC complex can be used in an immobilized form on a support which synthesizes the separation of the positively-reacting T cell population from other T cells. T cell lines can be set-up from the T cell subpopulation isolated in this manner by restimulation. These autoreactive T cell lines can then be used to immunize patients.

[0085] A specific immune therapy of type I diabetes comprises firstly the isolation of specific T cell lines against an autoantigen e.g. GAD 65 from IDDM patients. Then the fine specificity of the T cell lines is determined i.e. the autoreactive peptides are identified. Those T cell lines are

selected for the later inoculation of the patients which recognize a predominant peptide i.e. a peptide against which several of the isolate T cell lines react. In particular these are T cell lines which recognize the amino acid sequences (I), (II), (III), (IV), (V), (VI) or (VII).

[0086] If no unequivocal predominant peptide can be found in the patient, several T cell lines have to be mixed for the later inoculation. The selected T cell clones are stimulated again before the inoculation with antigen-presenting cells and the corresponding peptides in order to ensure a good expression of activation molecules and in particular the T cell receptors. Then the T cell lines are inactivated e.g. by heat treatment or/and radioactive irradiation preferably in a dose in the range of 4000-10000 rad particularly preferably ca. 8000 rad and injected subcutaneously into the patient from which they were obtained using a cell number of preferably 10^7 to 5×10^7 . Usually at least three injections are distributed over a period of 6 to 12 months.

[0087] Subsequently one can test the T cell response of the patient to the inoculate. For this purpose the peripheral blood lymphocytes (PBLs) of the patient are isolated e.g. by means of Ficoll density gradient centrifugation and the proliferation caused by the inoculate is tested in the standard proliferation test. If the immunization has proceeded successfully there should be a clearly detectable proliferation of the patient's PBLs towards the inoculate. A further control of the success of the immunization can be carried out by determining the frequencies of the GAD-reactive T cells of the patient during the course of the immunization, this can for example be carried out by the standard method of limiting dilution using autologous stimulator cells which have been irradiated with e.g. 4000 rad after incubation with GAD. If the immunization has proceeded successfully the frequency of autoreactive T cells decreases considerably.

[0088] After further narrowing down the surface structures on the T cells of the inoculate that are recognized by the regulatory T cells it is then also possible to immunize with partial structures of the regulatory T cells e.g. with segments of the T cell receptor.

[0089] On the other hand T cells capable of dividing can be re injected in the case of an anti-tumour vaccination which can lead to an active immunization of the patient against tumour cells.

[0090] In the diagnostic and therapeutic methods for identifying or activating/inhibiting specific T cell subpopulations an anti-idiotypic antibody can be used instead of the peptides or peptide-MHC molecules according to the invention which simulate the action of the MHC peptide complex. Such antibodies can be easily obtained by using a specific T cell subpopulation against a particular peptide as the immunogen to produce an antibody (e.g. in a mouse) or by firstly producing a first antibody against the MHC peptide complex and then an anti-idiotypic antibody against the first antibody.

[0091] Thus a subject matter of the present invention is also an antibody (first antibody) against a peptide or peptide derivative according to the invention or against a complex according to the invention obtainable by immunization with the peptide, peptide derivative or complex according to the invention and isolating an antibody produced by immunization preferably a monoclonal antibody produced by the method of Köhler and Milstein or further development thereof.

[0092] Finally the invention also concerns an anti-idiotypic antibody against the first antibody obtainable by immunization with the first antibody which is directed against the peptide or peptide derivative or the complex and isolation of an anti-idiotypic antibody obtained by immunization.

[0093] Yet a further subject matter of the present invention is a T cell which reacts with an autoreactive peptide, peptide derivative or peptide mimetic or a complex of peptide and MHC molecule according to the invention. Preferred examples are T cells which are derived from the T cell lines R.B., M.C., 24/31 or 40/2 or have an equivalent T cell receptor binding specificity i.e. recognize a peptide presented by a MHC molecule or a peptide derivative having the amino acid sequences (I), (II), (III), (IV), (V), (VI) or/and (VII) or/and partial regions of these amino acid sequences. The T cell line <GAD> 40/2 has been deposited on the 10.07.1996 at the "Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)", Mascheroder Weg 1b, D 38124 Braunschweig according to the rules of the Budapest Treaty under the reference No. DSM ACC 2278. A confirmation of receipt by the depository office is attached to the application documents.

[0094] Examples of preferred T cells have a T cell receptor which comprises a TCR α chain containing one of the CDR3 regions shown in FIG. 5 or/and a TCR β chain containing one of the CDR3 regions shown in FIG. 6. The invention also concerns T cell receptors which have amino acid sequences that are at least 70% homologous, preferably at least 80% homologous and particularly preferably at least 90% homologous to the CDR3 regions shown in FIG. 5 or 6.

[0095] Yet a further subject matter of the present invention is a polypeptide having T cell receptor activity which binds to an inventive peptide, peptide derivative, peptide mimetic or to a MHC complex containing one of these. A polypeptide according to the invention preferably comprises a TCR α chain containing one of the CDR3 regions shown in FIG. 5 or an amino acid sequence that is at least 70% homologous thereto or/and a TCR β chain containing one of the CDR3 regions shown in FIG. 6 or an amino acid sequence that is at least 70% homologous thereto.

[0096] Finally the present invention also concerns the use of peptides of GAD, in particular human GAD 65, peptide derivatives derived therefrom or peptide mimetics for the production of a pharmaceutical agent which leads to the formation of an immune tolerance when administered to diabetes patients. Peptides having the amino acid sequences (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII) or amino acid sequences proposed in EP 95 100 764.0, partial regions of these peptides with a length of at least 6 amino acids or/and amino acids with an essentially equivalent specificity or/and affinity of binding MHC molecules as the aforementioned peptide sequences are preferably used for this. The peptides preferably have a length of at least 8 amino acids particularly preferably a length of 10 to 25 amino acids.

[0097] The basis of this invention are observations that were made during the in vitro use of peptides for T cell stimulation. Thus if already established T cell lines are stimulated with a peptide that has been identified as being reactive e.g. a peptide with a length of 20 amino acids, then a proliferation occurs which is almost as high as when using

the native antigen e.g. recombinant human GAD 65 kd. When the T cells that are expanded in this manner are again restimulated in a second cycle after ca. 10 days a much weaker proliferative response is obtained than if the native antigen is used in the first cycle. This finding is independent of whether the peptide or the native antigen is used again in the second cycle. A third restimulation usually ends in a complete dying of the T cells even if native GAD 65 kd is used as the antigen.

[0098] For this form of application the peptides are administered in relatively high doses preferably of 1 to 100 mg particularly preferably of 3 to 30 mg and most preferably of 5 to 10 mg per kg body weight.

[0099] In addition it is preferred that after the first administration of the peptides i.e. the first vaccination, at least a further second vaccination and particularly preferably at least a third vaccination is carried out. In the second and subsequent optional vaccinations the peptides, complete GAD or/and a part thereof containing the sequence of the peptide that were already used for the first vaccination are preferably used. In the case of a multiple vaccination the intervals between the individual vaccinations are preferably 5 to 25 days and particularly preferably 7 to 14 days.

[0100] In addition it is intended to elucidate the invention by the following examples in conjunction with the FIGS. 1, 23A, 3B, 3C, 4A, 4B, 5 and 6 and the sequence protocols SEQ ID NO. 1 to 30.

[0101] FIG. 1 shows autoreactive amino acid sequences according to EP 95 100 764.0,

[0102] FIG. 2 shows further autoreactive amino acid sequences according to EP 95 100 764.0,

[0103] FIG. 3A shows the result of a peptide screening assay of the T cell lines R.B. and M.C. using recombinant GAD and peptide pool,

[0104] FIG. 3B shows the result of a proliferation assay of the T cell line R.B. with individual peptides from rGAD,

[0105] FIG. 3C shows the result of a proliferation assay of the T cell line M.C. with individual peptides from rGAD,

[0106] FIG. 4A shows the result of a peptide screening assay of the T cell line 24/31 using recombinant human GAD or peptide pools,

[0107] FIG. 4B shows the result of a proliferation assay of the T cell line 24/31 using individual peptides from GAD,

[0108] FIG. 5 shows the result of sequencing TCR α chains from clones of the T cell lines 40/2 and 24/31,

[0109] FIG. 6 shows the result of sequencing TCR β chains from clones of the T cell lines 40/2 and 24/31.

[0110] SEQ ID NO. 1-7 show the autoreactive amino acid sequences (I)-(VII) according to the invention

[0111] SEQ ID NO. 8-11 show the autoreactive amino acid sequences according to FIG. 1,

[0112] SEQ ID NO. 12-28 show the autoreactive amino acid sequences according to FIG. 2 and

[0113] SEQ ID NO. 29-30 show further autoreactive amino acid sequences according to EP 95 100 764.0.

EXAMPLE 1

Establishing GAD-specific T Cell Lines

[0114] 1. Primary Stimulation

[0115] The peripheral blood lymphocytes (PBLs) are isolated by ficoll density gradient centrifugation from EDTA blood of type I diabetics. The cells are washed twice in RPMI medium and then taken up in a culture medium composed of RPMI 1640, 5% human serum, 2 mM glutamine and 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. 100 µl cell suspension corresponding to 100,000 cells is sown per well of a 96 well round-bottom plate. Subsequently recombinant human GAD 65 kd (rGAD) is added which has been expressed in a baculovirus system at a final concentration of 3 to 5 µg/ml. The cells are incubated for 3-4 days in an incubator at 37° C./7% CO₂. After this period 100 µl IL-2 (5 U/ml) is added. After a further 3-4 days 100 µl is aspirated from all culture preparations and again 100 µl IL-2 (5 U/ml) is added. This is repeated every 3-4 days.

[0116] 2. Restimulation

[0117] The first restimulation is carried out on the 14th day after the start of the primary stimulation. In comparison to the primary stimulation twice the number of autologous PBLs are isolated by means of ficoll and adjusted to a cell concentration of 2×10^6 /ml for this. One half of these stimulator cells is incubated with the antigen rGAD (final concentration 3 to 5 µg/ml) for 2 hours/37° C./7% CO₂. The other half is incubated only with culture medium without antigen under the same conditions. Subsequently all stimulator cells are irradiated with 4000 rad. The stimulator cells are then distributed in 96 well round-bottom plates (each time 100,000 cells/well) and such that always one well containing stimulator cells containing antigen is adjacent to a well with stimulator cells without antigen.

[0118] Subsequently the T cells are prepared from the primary stimulation preparations. For this purpose the supernatant of the primary stimulation mixtures are aspirated and the cells are washed twice in the plates with 100 µl wash medium in each case (Dulbeccos modified eagle medium=DMEM). Between washes the cells in the plates are centrifuged at 400 g. Subsequently the cells are taken up in 100 µl culture medium in each case and 50 µl of each is distributed into two adjacent wells of the restimulation plate. In this way the T cells in one well are incubated with antigen and in the adjacent well without antigen the antigen-specificity of the restimulation can be controlled.

[0119] After the 2nd or 3rd day after the beginning of the restimulation it is possible to microscopically assess the proliferation. In this case only those microculture pairs are regarded as relevant in which proliferation occurs only in the well in which antigen is present. From the 4th day onwards 100 µl IL-2 (5 U/ml) is again added to each culture well. Up to the 14th day ca. 50% of the culture medium is replaced by IL-2 (5 U/ml) every 3-4 days.

[0120] If growth is good the cultures are divided onto several 96 well plates. If the restimulation is later they can be divided into larger wells. A restimulation is carried out every 2 weeks by the aforementioned method. From the 3rd restimulation onwards the specificity of the microcultures is determined in a proliferation test.

[0121] 3. Proliferation Test using Recombinant Human GAD 65 kd

[0122] All tests are carried out in at least double preparations.

[0123] a) Stimulator Cells:

[0124] Autologous PBLs or PBLs with identical HLA class II antigens of a normal donor are used as stimulator cells (APC). The PBLs are divided in a number of 100,000 per well of a 96 well plate and admixed with rGAD at a final concentration of 3 to 5 µg/ml. In control preparations an equal volume of medium is placed in the wells instead of antigen. After incubating for 2 hours at 37° C. and 7% CO₂ the stimulator cells are irradiated with 4000 rad.

[0125] b) T cells

[0126] The T cells used are always derived from the final phase of a restimulation period. They are washed three times with DMEM to free them of antigen and IL-2 and 6000 to 10,000 cells are distributed per 96 well.

[0127] After 3-4 days at 37° C./7% CO₂ 1 µCi 3H-thymidine was added and it was incubated for a further 16-20 hours. Afterwards the cells are transferred onto a glass fibre filter using a cell harvester instrument and the incorporated radioactivity is determined in a B counter instrument. The proliferation activity of the T cell lines is expressed by a stimulation index (SI). This is the quotient of the cpm in the presence of rGAD divided by the cpm in the control preparations without antigen. FIG. 3A (column rGAD) shows a typical result of a proliferation test using rGAD and the lines R.B. and M.C.

[0128] 4. Proliferation Test using peptides which are Derived from the H-GAD 65 kd Sequence

[0129] T cell lines which had been expanded over at least 4 restimulation cycles and which reacted with rGAD in the proliferation test were additionally tested with overlapping peptides of rGAD. The object of these experiments is to define the epitopes of rGAD recognized by the T cells. For this overlapping 20 mer peptide of rGAD are firstly synthesized (overlapping region 10 amino acids, a total of 59 different peptides).

[0130] In each case 4-5 of these peptides are combined to a pool and added to the stimulator cells at a final concentration of 5 µg/ml (preparation of stimulator cells as described in section 3a).

[0131] Afterwards 6000-20,000 T cells are added per microculture well. The subsequent procedure is analogous to that described in section 3b.

[0132] FIG. 3A shows the results of this peptide screening assay. The T cell line R.B. reacts with the peptide pool which contains the rGAD sequence section 46-115 whereas the T cell line M.C. recognizes the sequence section 216-285. The reactivities of the T cell lines R.B. and M.C. with the individual peptides of the respective peptide pool are shown in FIGS. 3B and 3C. The line R.B. reacts exclusively with the peptide p86-105 whereas the line M.C. is specific for the peptide p246-265. In these proliferation tests the peptides were used at a concentration of 3 µg/ml.

[0133] FIG. 4A shows the result of a further peptide screening test using the T cell line 24/31. This T cell line

reacts specifically with the peptide pool 1, 4 and 11. The reactivities of this T cell line with the individual peptides

in the presentation of the peptide either via the DR allele DRB1*0501 or 1601 or via the DQB1*0602 allel.

TABLE 1

T cell line proliferation					
		peptide			
APC	DRB1*:DQB1*	no antigen (CPM)	rGAD (SI)	86-105 (SI)	246-265 (SI)
R.B. T cell line					
PBMC	0101/0401:0501/0302	898	56	28	
JESTHOM	0101:0501	840	—	20	
HOM2	0101:0501	215	—	118	
YAR	0402:0302	2859	—	—	
MZ070782	0102:0501	3000	—	—	
PE117	0404:0302	6238	—	—	
DEU	0401:0301	2182	—	—	
M.C. T cell line					
PBMC	1501/1302:0602/0604	864	32		28
HHKB	1301:0603	749	—		—
KAS011	1601:0502	961	—		—
CMW	1301:0603	792	—		—
E4181324	1502:0601	896	—		34
WT47	1302:0604	526	—		—
WT8	1501:0602	1079	11		41
HO31	1302:0604	1300	—		—
EA	1501:0602	3298	13		12

from these pools is shown in FIG. 4B. From this it can be seen that the T cell line 24/31 reacts with the peptides p166-185 and p176-195.

EXAMPLE 2

Determination of the Subtype of MHC Molecules which Present the T Cell Line R.B. and M.C. Autoreactive Peptides

[0134] The experimental procedure is carried out analogous to example 1.4. However, no autologous PBLs were used as antigen-presenting cells but rather Epstein Barr virus transformed B cells with defined MHC alleles (so-called homozygote typing cell lines). These were selected such that there is only a partial correspondence with the MHC class II molecules of the donor of the T-cell lines e.g. identity with regard to the DR allele, non identity with regard to the DQ allele. In a departure from the described example 1.4 the peptides were washed out after the antigen pulse in order to avoid an autopresentation by the T cells.

[0135] The results of this test are shown in Table 1. The T cell proliferation is expressed as a stimulation index (SI).

[0136] The result of this analysis is unequivocal in the case of the T cell line R.B. Only when the antigen-presenting cells present the peptide p86-106 in association with DRB1*0101, is there a stimulation of the T cells. Other DR alleles cannot present the peptide and involvement of the DQ allele DQB1*0501 can be excluded (see result with the antigen-presenting cells MZ070782). Thus DRB1*0101 is the restriction element for the T cell line R.B. The restriction element for the T cell line M.C. could not be elucidated in detail by this type of analysis since DR allele DRB1*0501 and the DQ allele DQB1*0602 are not present closely coupled in the Caucasian population. The analysis resulted

EXAMPLE 3

Identification of the Autoreactive Peptide p556-p575

[0137] Analogous to the procedure described in example 1.4 a screening was carried out for further autoreactive peptides from the human GAD 65 kd. In this case it was found that the T cell line 40/2 was reacted with an individual peptide pool. When examining individual peptides of this peptide pool it was found that the T cell line 40/2 exclusively reacted with the peptide p556-575.

[0138] In order to determine the isotype of MHC molecules which present the autoreactive peptide p556-575, autologous PBLs were preincubated with monoclonal antibodies which recognize HLA-DR, HLA-DQ and HLA class I molecules. Peptide p556-575 was then added. The T cells were added after an intermediate incubation of 3 hours and a proliferation test was carried out. In this process it was found that a significant inhibition of proliferation only occurs in the presence of the monoclonal antibody which recognizes HLA-DR. Since the patient which has been derived from the T cell line 40/2 expressed the allele DRB1*0401 this is therefore identified as a restriction element.

EXAMPLE 4

Identification of T Cell Receptors (TCR)

[0139] Total RNA was isolated from T cells in order to identify and sequence GAD-specific TCR. For this the cells in suspension were washed with PBS and the cell pellet was resuspended with 0.2 ml RNAzol-B per 1×10^6 cells.

[0140] After mechanically resuspending the lysates several times and optionally adding yeast tRNA as a carrier

matrix, the RNA was extracted by addition of 0.2 ml chloroform per 2 ml homogenate, subsequently mixing for 15 sec. and storing for 5 minutes on ice.

[0141] After a centrifugation step of 12,000 g for 15 min. the aqueous phase was removed and transferred into a new reaction vessel. The first precipitation of the RNA was achieved by addition of an identical volume of isopropanol and subsequent storage for at least 15 min. at 4° C. After centrifugation for 15 min. at 12,000 g and 4° C. the RNA was obtained as a pellet at the bottom of the vessel.

[0142] After discarding the supernatant the RNA pellet was purified of salts by briefly mixing in 75% ethanol. After centrifugation (7,500 g, 4° C., 8 min) the pellet was dissolved in 100 µl water that had been treated with diethyl pyrocarbonate (DEPC) and again precipitated with 250 µl ethanol and 10 µl 2 M NaCl for at least 1 h at -20° C. The centrifugation and washing steps after the second precipitation were carried out as described for the first precipitation. After drying the pellet in air the RNA was resuspended in H₂O-DEPC.

[0143] cDNA was synthesized from the RNA by reverse transcription. For this ca. 3 µg total RNA was incubated for 10 min at 55° C. with 30 ng p-CαST (a specific primer for the TCR α chain having the sequence 5'-CAC TGA AGA TCC ATC ATC TG-3') and 30 ng p-CβST (a specific primer for the β chain having the sequence 5'-TAG AGG ATG GTG GCA GAC AG-3') in a reaction volume of 10 µl. Subsequently 38 µl RAV-2-RT buffer (100 mM Tris-HCl pH

[0144] 8.3; 140 mM KCl, 10 mM MgCl₂; 2 mM dithiothreitol, 0.1 mM of each dNTP), 1 µl (0.75 U) rRNasin and 1 µl (18 U) reverse transcriptase were added by pipette. The reverse transcription was carried out for 90 min. at 42° C. followed by a denaturation step at 68° C. for 5 min. It was stored at -80° C. until use.

[0145] Subsequently a polymerase chain reaction (PCR) was carried out. Whether the corresponding V family was expressed or not was indicated by the occurrence of an amplificate using 5'-family specific primers for the variable domains of the α and β chains. The 3' primers were located in the constant domain and were the same in all α and β preparations. A control amplificate which is located in the constant domain and does not overlap the specific amplification product indicates whether the PCR reaction has worked in this preparation and could be used for the semi-quantitative determination of V-family specific expression.

[0146] The primers were also used in a biotinylated form in order to enable a subsequent purification of the PCR products by coupling to a magnetic particulate solid phase (streptavidin-coated beads).

[0147] The PCR was carried out using a thermostable DNA polymerase with the following reaction scheme:

94° C.	4 min.	predenaturation
94° C.	30 sec.	DNA denaturation
56° C.	30 sec.	annealing
72° C.	1 min.	extension
72° C.	5 min.	filling up all single strands in the reaction solution (only at the end).

[0148] The number of reaction cycles in the PCR was usually 35.

[0149] The PCR fragments obtained in this manner were sequenced.

[0150] The 4 independently isolated GAD-specific T cell clones of patient 24: 24/31#1/1, 24/31#1/4, 24/31#9, 24/31#PF7 all expressed the same TCR. This is composed of: Vβ8 (AV8S1A1) and Vβ5 (BV5S1A1T). The J gene segments and the CDR3 regions used are also identical.

[0151] The T cell clone 40/2#20 of patient 40 expresses 2 α chains, i.e. Vα2 (AV2S1A2) and Vα21 (ADV21S1A1) and a Vβ chain Vβ2 (BV2S1A4T).

[0152] The sequence data of the CDR3 regions from the TCR α and TCR β chains are shown in FIGS. 5 and 6.

[0153] The complete sequences of the TCR can be determined without difficulty with the aid of known sequences from the GENBank/EMBL data bank. The respective accession numbers are as follows:

Vα8	(AV8S1A1)	X04954/M13734
Vα2	(AV2S1A2)	M17652
Vα21	(ADV21S1A1)	M15565
Vβ5	(BV5S1A1T)	X04954
Vβ2	(BV2S1A4T)	M11954

[0154]

SEQUENCE LISTING

<160> NUMBER OF SEQ ID NOS: 47

<210> SEQ ID NO 1

<211> LENGTH: 20

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 1

Asp Val Asn Tyr Ala Phe Leu His Ala Thr Asp Leu Leu Pro Ala Cys
1 5 10 15

Asp Gly Glu Arg

-continued

20

<210> SEQ ID NO 2
 <211> LENGTH: 20
 <212> TYPE: PRT
 <213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 2

Ser Asn Met Tyr Ala Met Met Ile Ala Arg Phe Lys Met Phe Pro Glu
 1 5 10 15

Val Lys Glu Lys
 20

<210> SEQ ID NO 3
 <211> LENGTH: 20
 <212> TYPE: PRT
 <213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 3

Asn Trp Glu Leu Ala Asp Gln Pro Gln Asn Leu Glu Glu Ile Leu Met
 1 5 10 15

His Cys Gln Thr
 20

<210> SEQ ID NO 4
 <211> LENGTH: 20
 <212> TYPE: PRT
 <213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 4

Thr Leu Lys Tyr Ala Ile Lys Thr Gly His Pro Arg Tyr Phe Asn Gln
 1 5 10 15

Leu Ser Thr Gly
 20

<210> SEQ ID NO 5
 <211> LENGTH: 20
 <212> TYPE: PRT
 <213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 5

Pro Arg Tyr Phe Asn Gln Leu Ser Thr Gly Leu Asp Met Val Gly Leu
 1 5 10 15

Ala Ala Asp Trp
 20

<210> SEQ ID NO 6
 <211> LENGTH: 20
 <212> TYPE: PRT
 <213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 6

Thr Tyr Glu Ile Ala Pro Val Phe Val Leu Leu Glu Tyr Val Thr Leu
 1 5 10 15

Lys Lys Met Arg
 20

<210> SEQ ID NO 7
 <211> LENGTH: 20
 <212> TYPE: PRT

-continued

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 7

Phe Phe Arg Met Val Ile Ser Asn Pro Ala Ala Thr His Gln Asp Ile
 1 5 10 15

Asp Phe Leu Ile
 20

<210> SEQ ID NO 8

<211> LENGTH: 14

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 8

Ile Leu Ile Lys Cys Asp Glu Arg Gly Lys Met Ile Pro Ser
 1 5 10

<210> SEQ ID NO 9

<211> LENGTH: 14

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 9

Leu Gly Ile Gly Thr Asp Ser Val Ile Leu Ile Lys Cys Asp
 1 5 10

<210> SEQ ID NO 10

<211> LENGTH: 14

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 10

Leu Ala Phe Leu Gln Asp Val Met Asn Ile Leu Leu Gln Tyr
 1 5 10

<210> SEQ ID NO 11

<211> LENGTH: 14

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 11

Tyr Asp Leu Ser Tyr Asp Thr Gly Asp Lys Ala Leu Gln Cys
 1 5 10

<210> SEQ ID NO 12

<211> LENGTH: 14

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 12

Val Ser Tyr Gln Pro Leu Gly Asp Lys Val Asn Phe Phe Arg
 1 5 10

<210> SEQ ID NO 13

<211> LENGTH: 14

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 13

Leu Ala Ala Asp Trp Leu Thr Ser Thr Ala Asn Thr Asn Met
 1 5 10

-continued

<210> SEQ ID NO 14
 <211> LENGTH: 14
 <212> TYPE: PRT
 <213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 14

Leu Leu Tyr Gly Asp Ala Glu Lys Pro Ala Glu Ser Gly Gly
 1 5 10

<210> SEQ ID NO 15
 <211> LENGTH: 14
 <212> TYPE: PRT
 <213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 15

Val Asn Tyr Ala Phe Leu His Ala Thr Asp Leu Leu Pro Ala
 1 5 10

<210> SEQ ID NO 16
 <211> LENGTH: 14
 <212> TYPE: PRT
 <213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 16

Leu Leu Gln Tyr Val Val Lys Ser Phe Asp Arg Ser Thr Lys
 1 5 10

<210> SEQ ID NO 17
 <211> LENGTH: 14
 <212> TYPE: PRT
 <213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 17

Phe Thr Tyr Glu Ile Ala Pro Val Phe Val Leu Leu Glu Tyr
 1 5 10

<210> SEQ ID NO 18
 <211> LENGTH: 14
 <212> TYPE: PRT
 <213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 18

Leu Glu Tyr Val Thr Leu Lys Lys Met Arg Glu Ile Ile Gly
 1 5 10

<210> SEQ ID NO 19
 <211> LENGTH: 14
 <212> TYPE: PRT
 <213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 19

Asn Met Tyr Ala Met Met Ile Ala Arg Phe Lys Met Phe Pro
 1 5 10

<210> SEQ ID NO 20
 <211> LENGTH: 14
 <212> TYPE: PRT
 <213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 20

Lys Ile Trp Met His Val Asp Ala Ala Trp Gly Gly Gly Leu
 1 5 10

-continued

<210> SEQ ID NO 21
 <211> LENGTH: 14
 <212> TYPE: PRT
 <213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 21

Trp Gly Gly Gly Leu Leu Met Ser Arg Lys His Lys Trp Lys
 1 5 10

<210> SEQ ID NO 22
 <211> LENGTH: 14
 <212> TYPE: PRT
 <213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 22

Glu Gly Tyr Glu Met Val Phe Asp Gly Lys Pro Gln His Thr
 1 5 10

<210> SEQ ID NO 23
 <211> LENGTH: 14
 <212> TYPE: PRT
 <213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 23

Arg Tyr Phe Asn Gln Leu Ser Thr Gly Leu Asp Met Val Gly
 1 5 10

<210> SEQ ID NO 24
 <211> LENGTH: 14
 <212> TYPE: PRT
 <213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 24

Trp Leu Thr Ser Thr Ala Asn Thr Asn Met Phe Thr Tyr Glu
 1 5 10

<210> SEQ ID NO 25
 <211> LENGTH: 14
 <212> TYPE: PRT
 <213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 25

Thr Ala Asn Thr Asn Met Phe Thr Tyr Glu Ile Ala Pro Val
 1 5 10

<210> SEQ ID NO 26
 <211> LENGTH: 14
 <212> TYPE: PRT
 <213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 26

Leu Val Ser Ala Thr Ala Gly Thr Thr Val Tyr Gly Ala Phe
 1 5 10

<210> SEQ ID NO 27
 <211> LENGTH: 14
 <212> TYPE: PRT
 <213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 27

Tyr Ile Pro Pro Ser Leu Arg Thr Leu Glu Asp Asn Glu Glu

-continued

```

1           5           10

<210> SEQ ID NO 28
<211> LENGTH: 14
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 28
Val Ile Ser Asn Pro Ala Ala Thr His Gln Asp Ile Asp Phe
 1           5           10

<210> SEQ ID NO 29
<211> LENGTH: 25
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 29
Gly Met Ala Ala Leu Pro Arg Leu Ile Ala Phe Thr Ser Glu His Ser
 1           5           10           15
His Phe Ser Leu Lys Lys Gly Ala Ala
                20           25

<210> SEQ ID NO 30
<211> LENGTH: 20
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 30
Glu Arg Gly Lys Met Ile Pro Ser Asp Leu Glu Arg Arg Ile Leu Glu
 1           5           10           15
Ala Lys Gln Lys
                20

<210> SEQ ID NO 31
<211> LENGTH: 8
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 31
Xaa Pro Glu Val Lys Thr Lys Glx
 1           5

<210> SEQ ID NO 32
<211> LENGTH: 8
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 32
Xaa Pro Glu Val Lys Glu Lys Glx
 1           5

<210> SEQ ID NO 33
<211> LENGTH: 14
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 33
Ser Asn Pro Ala Ala Thr His Gln Asp Ile Asp Phe Leu Ile
 1           5           10

<210> SEQ ID NO 34

```

-continued

<211> LENGTH: 27
 <212> TYPE: DNA
 <213> ORGANISM: Homo sapiens
 <220> FEATURE:
 <221> NAME/KEY: CDS
 <222> LOCATION: (1)..(27)

<400> SEQUENCE: 34

ggc gga agc caa gga aat ctc atc ttt
 Gly Gly Ser Gln Gly Asn Leu Ile Phe
 1 5

27

<210> SEQ ID NO 35
 <211> LENGTH: 9
 <212> TYPE: PRT
 <213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 35

Gly Gly Ser Gln Gly Asn Leu Ile Phe
 1 5

<210> SEQ ID NO 36
 <211> LENGTH: 24
 <212> TYPE: DNA
 <213> ORGANISM: Homo sapiens
 <220> FEATURE:
 <221> NAME/KEY: CDS
 <222> LOCATION: (1)..(24)

<400> SEQUENCE: 36

aac aga gat gac aag atc atc ttt
 Asn Arg Asp Asp Lys Ile Ile Phe
 1 5

24

<210> SEQ ID NO 37
 <211> LENGTH: 8
 <212> TYPE: PRT
 <213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 37

Asn Arg Asp Asp Lys Ile Ile Phe
 1 5

<210> SEQ ID NO 38
 <211> LENGTH: 21
 <212> TYPE: DNA
 <213> ORGANISM: Homo sapiens
 <220> FEATURE:
 <221> NAME/KEY: CDS
 <222> LOCATION: (1)..(21)

<400> SEQUENCE: 38

agc aat cag ccc cag cat ttt
 Ser Asn Gln Pro Gln His Phe
 1 5

21

<210> SEQ ID NO 39
 <211> LENGTH: 7
 <212> TYPE: PRT
 <213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 39

Ser Asn Gln Pro Gln His Phe
 1 5

-continued

<210> SEQ ID NO 40
 <211> LENGTH: 21
 <212> TYPE: DNA
 <213> ORGANISM: Homo sapiens
 <220> FEATURE:
 <221> NAME/KEY: CDS
 <222> LOCATION: (1)..(21)

<400> SEQUENCE: 40

agc tac aat gag cag ttc ttc
 Ser Tyr Asn Glu Gln Phe Phe
 1 5

21

<210> SEQ ID NO 41
 <211> LENGTH: 7
 <212> TYPE: PRT
 <213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 41

Ser Tyr Asn Glu Gln Phe Phe
 1 5

<210> SEQ ID NO 42
 <211> LENGTH: 12
 <212> TYPE: DNA
 <213> ORGANISM: Homo sapiens
 <220> FEATURE:
 <221> NAME/KEY: CDS
 <222> LOCATION: (1)..(12)

<400> SEQUENCE: 42

agt gcg ggt tgg
 Ser Ala Gly Trp
 1

12

<210> SEQ ID NO 43
 <211> LENGTH: 4
 <212> TYPE: PRT
 <213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 43

Ser Ala Gly Trp
 1

<210> SEQ ID NO 44
 <211> LENGTH: 18
 <212> TYPE: DNA
 <213> ORGANISM: Homo sapiens
 <220> FEATURE:
 <221> NAME/KEY: CDS
 <222> LOCATION: (1)..(18)

<400> SEQUENCE: 44

agc ttg gat gcg agc ggg
 Ser Leu Asp Ala Ser Gly
 1 5

18

<210> SEQ ID NO 45
 <211> LENGTH: 6
 <212> TYPE: PRT
 <213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 45

Ser Leu Asp Ala Ser Gly

-continued

1	5	
---	---	--

<210> SEQ ID NO 46
 <211> LENGTH: 20
 <212> TYPE: DNA
 <213> ORGANISM: Artificial Sequence
 <220> FEATURE:
 <223> OTHER INFORMATION: Description of Artificial Sequence: synthetic primer

 <400> SEQUENCE: 46

 cactgaagat ccatcatctg

	20
--	----

<210> SEQ ID NO 47
 <211> LENGTH: 20
 <212> TYPE: DNA
 <213> ORGANISM: Artificial Sequence
 <220> FEATURE:
 <223> OTHER INFORMATION: Description of Artificial Sequence: synthetic primer

 <400> SEQUENCE: 47

 tagaggatgg tggcagacag

- | | |
|--|--|
| <p>1. Peptide or peptide derivative comprising:</p> <p>(a) the amino acid sequence (I)</p> <p style="padding-left: 40px;">D-V-N-Y-A-F-L-H-A-T-D-L-L-P-A-C-D-G-E-R,</p> <p>(b) the amino acid sequence (II)</p> <p style="padding-left: 40px;">S-N-M-Y-A-M-M-I-A-R-F-K-M-F-P-E-V-K-E-K,</p> <p>(c) the amino acid sequence (III)</p> <p style="padding-left: 40px;">N-W-E-L-A-D-Q-P-Q-N-L-E-E-I-L-M-H-C-Q-T,</p> <p>(d) the amino acid sequence (IV)</p> <p style="padding-left: 40px;">T-L-K-Y-A-I-K-T-G-H-P-R-Y-F-N-Q-L-S-T-G,</p> <p>(e) the amino acid sequence (V)</p> <p style="padding-left: 40px;">P-R-Y-F-N-Q-L-S-T-G-L-D-M-V-G-L-A-A-D-W,</p> <p>(f) the amino acid sequence (VI)</p> <p style="padding-left: 40px;">T-Y-E-I-A-P-V-F-V-L-L-E-Y-V-T-L-K-K-M-R,</p> <p>(g) Amino acid sequence (VII)</p> <p style="padding-left: 40px;">F-F-R-M-V-I-S-N-P-A-A-T-H-Q-D-I-D-F-L-I,</p> <p>(h) partial regions of the amino acid sequence shown in (a), (b), (c), (d), (e), (f) or/and (g) with a length of at least 6 amino acids or/and</p> <p>(i) amino acid sequences which have an essentially equivalent specificity or/and affinity of binding to MHC molecules as the amino acid sequences shown in (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g) or/and (h).</p> <p>2. Peptide or peptide derivative as claimed in claim 1, wherein</p> <p style="padding-left: 40px;">it has at least a length of eight amino acids.</p> | <p>3. Peptide or peptide derivative as claimed in claim 1 or 2, wherein</p> <p style="padding-left: 40px;">it has at least a length of 10 amino acids.</p> <p>4. Peptide or peptide derivative as claimed in one of the claims 1 to 3, wherein</p> <p style="padding-left: 40px;">it has a length of up to 25 amino acids.</p> <p>5. Peptide or peptide derivative as claimed in one of the claims 1 to 4, wherein</p> <p style="padding-left: 40px;">it carries a marker group.</p> <p>6. Peptide mimetic, wherein</p> <p style="padding-left: 40px;">it has an essentially equivalent specificity or/and affinity of binding to MHC molecules as a peptide or peptide derivative as claimed in one of the claims 1 to 5.</p> <p>7. Complex which at least comprises a peptide or peptide derivative as claimed in one of the claims 1 to 5 or a peptide mimetic as a peptide or peptide derivative as claimed in one of the claims 1 to 5.</p> <p>7. Complex which at least comprises a peptide or peptide derivative as claimed in one of the claims 1 to 5 or a peptide mimetic as claimed in claim 6 which is bound to a MHC molecule or a peptide-binding derivative of a MHC molecule.</p> <p>8. Complex as claimed in claim 7, wherein</p> <p style="padding-left: 40px;">it comprises a MHC class II molecule or a peptide-binding derivative thereof.</p> <p>9. Complex as claimed in claim 8, wherein</p> <p style="padding-left: 40px;">it has a MHC class II molecules of types DR1, DR2, DR4 or DQ6.</p> <p>10. Complex as claimed in claim 9, wherein</p> <p style="padding-left: 40px;">the MHC class II molecule has the subtype DR B1*101, DR B1*1501, DR B1*1502, DR B1*1601, DR B5*0101, DR B1*0401 or DQ B1*0602.</p> <p>11. Complex as claimed in one of the claims 7 to 10, wherein</p> |
|--|--|

- it comprises a recombinant MHC molecule or a peptide-binding derivative thereof.
12. Complex as claimed in claim 11, wherein it comprises a soluble peptide-binding derivative of a MHC molecule.
13. Complex as claimed in one of the claims 7 to 12, wherein it carries a marker group.
14. Complex as claimed in one of the claims 7 to 13, wherein it at least contains 2 MHC molecules or MHC molecule derivatives which are associated by covalent or non-covalent interactions.
15. Complex as claimed in claim 24, wherein it contains peptide MHC molecule complexes that are cross-linked by chemical coupling reagents.
16. Complex as claimed in claim 14, wherein it contains MHC molecules or MHC molecule derivatives that are cross-linked with several MHC-binding regions via an oligomerized peptide component.
17. Complex as claimed in claim 14, wherein it contains peptide-MHC molecule complexes that are cross-linked by antibodies.
18. Pharmaceutical composition, wherein it contains a peptide or peptide derivative as claimed in one of the claims 1 to 5, a peptide mimetic as claimed in claim 6 or/and a complex as claimed in one of the claims 7 to 17 as the active component if desired in combination with common pharmaceutical additives.
19. Composition as claimed in claim 18, wherein it in addition comprises an accessory-stimulating component.
20. Composition as claimed in claim 19, wherein the accessory-stimulating component is selected from cytokines or/and the surface antigen B7.
21. Use of a pharmaceutical composition as claimed in one of the claims 18 to 20 for the production of an agent for the diagnosis of diseases or a predisposition for diseases which influence the immune system or for the diagnosis of tumour diseases or a predisposition of tumour diseases.
22. Use as claimed in claim 21 for the production of an agent for the diagnosis of autoimmune diseases or a predisposition of autoimmune diseases.
23. Use as claimed in claim 21 or 22 for the production of an agent for the diagnosis of diabetes or a predisposition of diabetes.
24. Method for the determination of a specific T cell subpopulation, wherein a sample containing T cells is contacted with a peptide or peptide derivative as claimed in one of the claims 1 to 5, a peptide mimetic as claimed in claim 6 or/and a complex as claimed in one of the claims 7 to 17 and the reaction of T cells with the peptide or complex is determined in the sample.
25. Method as claimed in claim 24, wherein the reaction of the T cells with a fluorescent-labelled peptide or complex is determined by FACS analysis.
26. Method as claimed in claim 24 or 25, wherein preactivated T cells are selected before or/and after contacting the T cells with the peptide or the complex.
27. Use of a pharmaceutical composition as claimed in one of the claims 18 to 20 for the production of an agent for therapy or prevention of diseases which influence the immune system.
28. Use as claimed in claim 27 for the production of an agent for the therapy or prevention of autoimmune diseases.
29. Use as claimed in claim 27 or 28 for the production of an agent for the therapy or prevention of diabetes.
30. Use of a peptide or peptide derivative as claimed in one of the claims 1 to 5, a peptide mimetic as claimed in claim 6 or a complex as claimed in one of the claims 7 to 17 for the production of an antigen in particular an immunogen or tolerogen.
31. Method for the isolation of a specific T cell subpopulation, wherein a sample containing T cells is contacted with a peptide or peptide derivative as claimed in one of the claims 2 to 5, a peptide mimetic as claimed in claim 6 or a complex as claimed in one of the claims 7 to 17, the T cells that react with the peptide or complex are identified and separated from other T cells if desired.
32. Method as claimed in claim 31, wherein preactivated T cells are selected before or/and after contacting the T cells with the peptide or the complex.
33. Use of T cells isolated according to the method as claimed in claim 31 or partial structures thereof for the production of an antigen.
34. Use as claimed in claim 33, wherein the T cells or partial structures thereof are re-injected into the patients from whom they are originally derived.
35. Use as claimed in claim 34, wherein inactivated T cells are re-injected.
36. Use as claimed in claim 35, wherein T cells capable of division are re-injected.
37. Antibody against a peptide or peptide derivative as claimed in one of the claims 1 to 5, a peptide mimetic as claimed in claim 6 or a complex as claimed in one of the claims 7 to 17, obtainable by immunization with a peptide, peptide derivative, peptide mimetic or complex and isolating an antibody produced by the immunization.
38. Anti-idiotypic antibody against an antibody as claimed in claim 37, obtainable by immunizing the antibody against the peptide, peptide derivative or peptide mimetic or the complex and isolating an anti-idiotypic antibody produced by the immunization.
39. T cell which reacts with a peptide or peptide derivative as claimed in one of the claims 1 to 3, a peptide mimetic as claimed in claim 6 or a complex as claimed in one of the claims 7 to 17.
40. Use of peptides of glutamic acid decarboxylase (GAD) peptide derivatives derived therefrom or peptide mimetics for the production of a pharmaceutical agent which leads to the formation of an immune tolerance when administered to patients with diabetes.
41. Use as claimed in claim 40, wherein the peptides, peptide derivatives or peptide mimetics are administered at a dose of 3 to 30 mg per kg body weight.

42. Use as claimed in claim 40 or 41, wherein

at least a second vaccination is carried out after administration of the peptides, peptide derivatives or peptide mimetics.

43. Use as claimed in one of the claims 40 to 42, wherein

in the second or optionally following vaccinations peptides, peptide derivatives or peptide mimetic complete GAD or/and a part thereof containing the sequence of the peptides which have already been used in the first vaccination are used.

44. Use as claimed in claim 43, wherein

the vaccinations are carried out each at intervals of 7 to 14 days.

45. Use as claimed in one of the claims 40 to 44, wherein

a mixture of various peptides, peptide derivatives or peptide mimetic is used.

46. T cell, wherein

it contains a T cell receptor which binds to a peptide or peptide derivative as claimed in one of the claims 1 to 5, to a peptide mimetic as claimed in claim 6 or to a complex as claimed in one of the claims 7 to 17.

47. T cell as claimed in claim 46, wherein

it has a T cell receptor which comprises a TCR α chain containing a CDR3 region shown in FIG. 5 or one that is at least 70% homologous thereto or/and a TCR β chain containing a CDR3 region shown in FIG. 6 or one that is at least 70% homologous thereto.

48. Polypeptide with T cell receptor activity, wherein

it binds to a peptide or peptide derivative as claimed in one of the claims 1 to 5, to a peptide mimetic as claimed in claim 6 or to a complex as claimed in one of the claims 7 to 17.

49. Polypeptide as claimed in claim 48, wherein

it comprises a TCR α chain containing a CDR3 region shown in FIG. 5 or an amino acid sequence that is at least 70% homologous thereto.

50. Polypeptide as claimed in claim 48 or 49, wherein

it comprises a TCR β chain containing a CDR3 region shown in FIG. 6 or an amino acid sequence that is at least 70% homologous thereto.

51. Nucleic acid, wherein

it codes for a polypeptide as claimed in one of the claims 48 to 50.

* * * * *

Fig. 1

I-L-I-K-C-D-E-R-G-K-M-I-P-S

L-G-I-G-T-D-S-V-I-L-I-K-C-D

L-A-F-L-Q-D-V-M-N-I-L-L-Q-Y

Y-D-L-S-Y-D-T-G-D-K-A-L-Q-C

Fig. 2

V-S-Y-Q-P-L-G-D-K-V-N-F-F-R
L-A-A-D-W-L-T-S-T-A-N-T-N-M
L-L-Y-G-D-A-E-K-P-A-E-S-G-G
V-N-Y-A-F-L-H-A-T-D-L-L-P-A
L-L-Q-Y-V-V-K-S-F-D-R-S-T-K
F-T-Y-E-I-A-P-V-F-V-L-L-E-Y
L-E-Y-V-T-L-K-K-M-R-E-I-I-G
N-M-Y-A-M-M-I-A-R-F-K-M-F-P
K-I-W-M-H-V-D-A-A-W-G-G-G-L
W-G-G-G-L-L-M-S-R-K-H-K-W-K
E-G-Y-E-M-V-F-D-G-K-P-Q-H-T
R-Y-F-N-Q-L-S-T-G-L-D-M-V-G
W-L-T-S-T-A-N-T-N-M-F-T-Y-E
T-A-N-T-N-M-F-T-Y-E-I-A-P-V
L-V-S-A-T-A-G-T-T-V-Y-G-A-F
Y-I-P-P-S-L-R-T-L-E-D-N-E-E
V-I-S-N-P-A-A-T-H-Q-D-I-D-F

Fig. 3

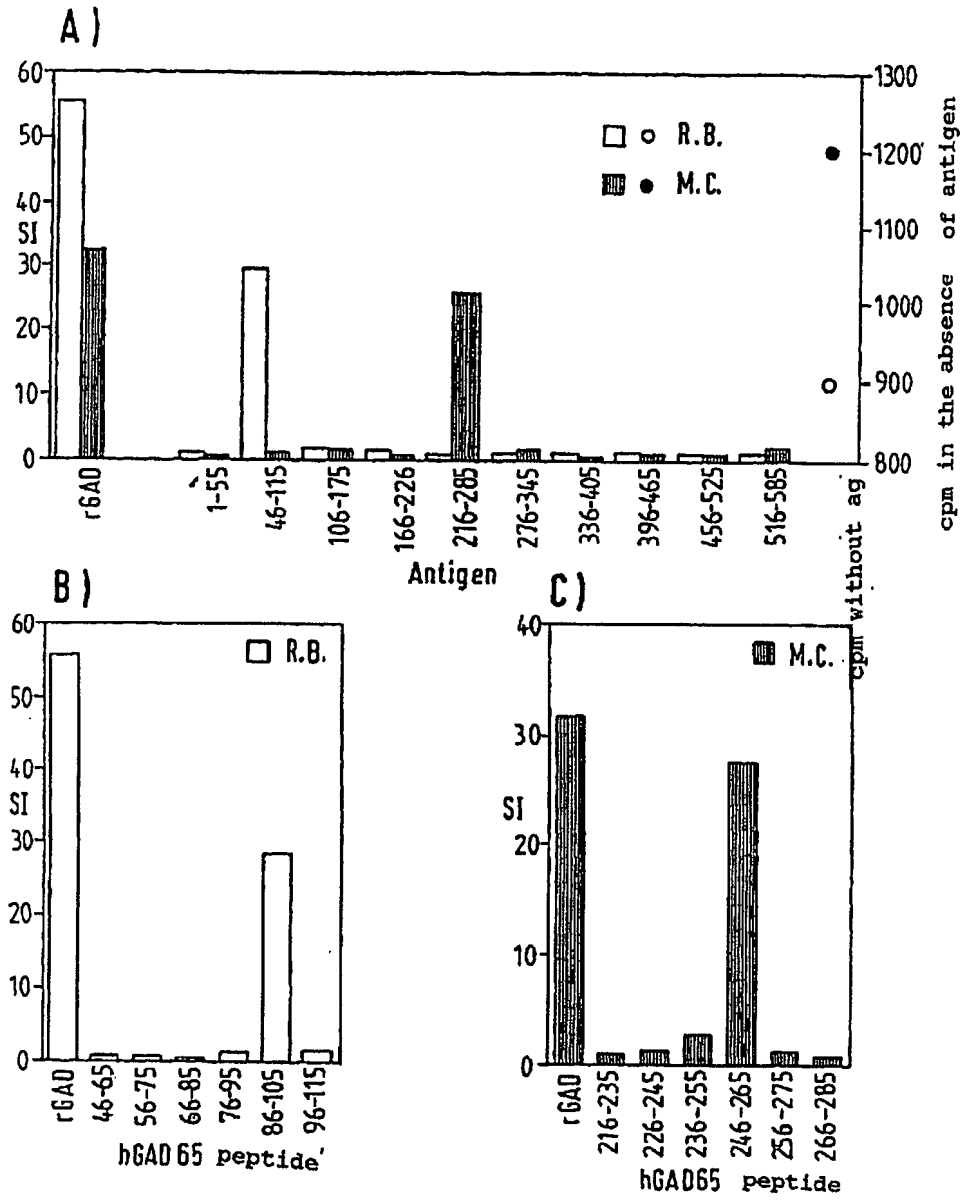


Fig. 4A

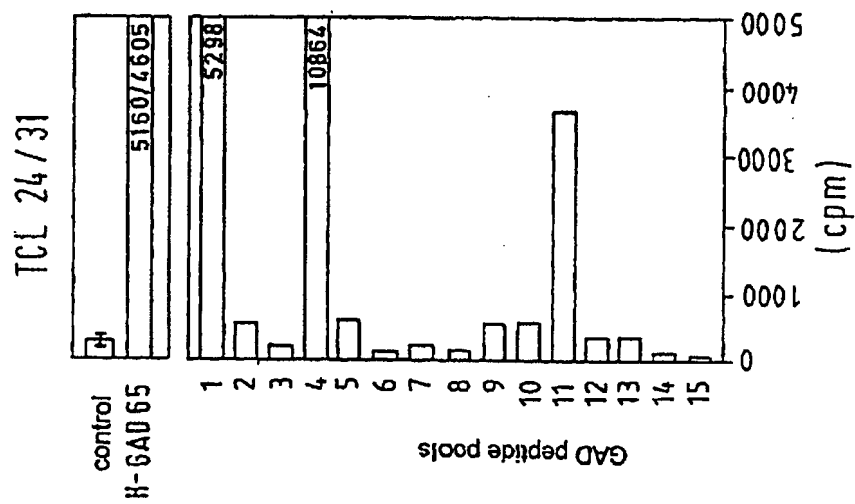
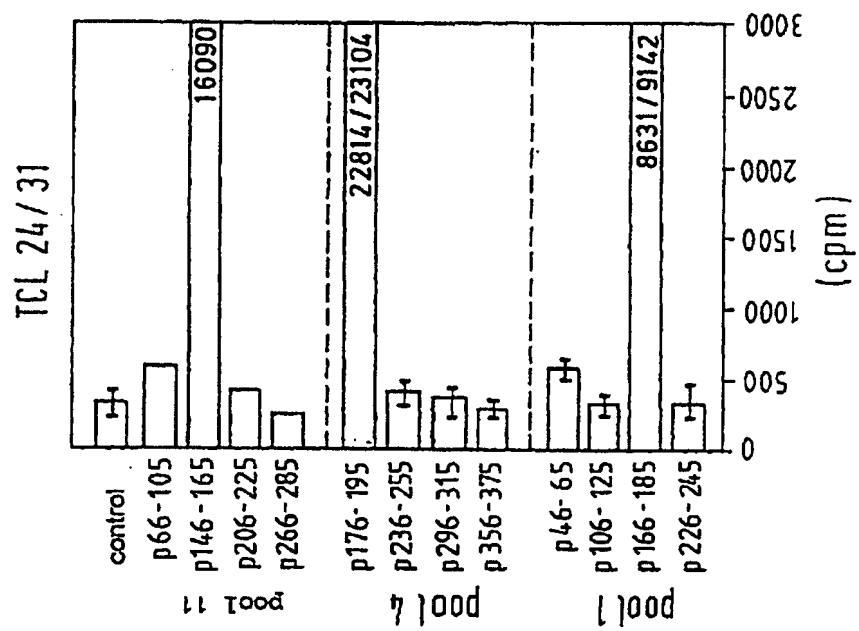


Fig. 4B



ALPHA CHAIN	TCRAV	N-Region	TCRAJ
Patient 40 Clone 40/2#20	C A V TGTGCCGTG TCRAV2S1A2	N I A AACATTGCT	G G S Q G N L I F GGCGGAAGCCAAGGAAATCTCATCTTT TCRAJ42
Patient 24 Clone 24/31#1/1	C A A TGTGCAGCA TCRAV8S1A1	R A M AGGGCCATG	N R D D K I I F AACAGAGATGACAAGATCATCTTT TCRAJ30
Patient 24 Clone 24/31#1/4	C A A TGTGCAGCA TCRAV8S1A1	R A M AGGGCCATG	N R D D K I I F AACAGAGATGACAAGATCATCTTT TCRAJ30
Patient 24 Clone 24/31#PF7	C A A TGTGCAGCA TCRAV8S1A1	R A M AGGGCCATG	N R D D K I I F AACAGAGATGACAAGATCATCTTT TCRAJ30
Patient 24 Clone 24/31#9	C A A TGTGCAGCA TCRAV8S1A1	R A M AGGGCCATG	N R D D K I I F AACAGAGATGACAAGATCATCTTT TCRAJ30

Fig. 5

BETA CHAIN	TCRBV	N-Region*	TCRBJ
Patient 40 Clone 2/20	C S V TGCACTGCT TCRBV2SLA4T	S A G W AGTGC GG GTTG	S N Q P Q H F AGCAATCAGCCCCAGCATTTT TCRBJ1.5
Patient 24 Clone 31/1/1	C X S TGCKCCAGC TCRBV5SLA1T	S L D A S G AGCTTGGATGCGAGCGGG	S Y N E Q F F AGCTACAATGAGCAGTTCTTC TCRBJ
Patient 24 Clone 31/1/4	C X S TGCKCCAGC TCRBV5SLA1T	S L D A S G AGCTTGGATGCGAGCGGG	S Y N E Q F F AGCTACAATGAGCAGTTCTTC TCRBJ
Patient 24 Clone 31/PF7	C X S TGCKCCAGC TCRBV5SLA1T	S L D A S G AGCTTGGATGCGAGCGGG	S Y N E Q F F AGCTACAATGAGCAGTTCTTC TCRBJ
Patient 24 Clone 31/9	C X S TGCKCCAGC TCRBV5SLA1T	S L D A S G AGCTTGGATGCGAGCGGG	S Y N E Q F F AGCTACAATGAGCAGTTCTTC TCRBJ

Fig. 6